

**Aus der Klinik für
Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie für Groß- und Kleintiere
mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Giessen
und dem
Hessischen Dienstleistungszentrum für
Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz;
HDLGN (Bieneninstitut Kirchhain)**

**Versuche zur Eignung verschiedener Puffer
bei der instrumentellen Besamung
der Bienenkönigin
(*Apis mellifera*)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**Eingereicht von
Wiebke Keiner-Stoehr**

Giessen 2004

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2004

© 2004 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-04-9

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
Tel. 0641/24466
Fax 0641/25375
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus der Klinik für
Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
für Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
Justus-Liebig-Universität Gießen
und dem
Hessischen Dienstleistungszentrum für
Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz;
HDLGN (Bieneninstitut Kirchhain)

**VERSUCHE ZUR EIGNUNG VERSCHIEDENER PUFFER
BEI DER INSTRUMENTELLEN BESAMUNG DER BIENENKÖNIGIN
(*Apis mellifera*)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
WIEBKE KEINER-STOEHR

Gießen 2004

Aus der Klinik für
Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
für Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
Justus-Liebig-Universität Gießen
und dem
Hessischen Dienstleistungszentrum für
Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz;
HDLGN (Bieneninstitut Kirchhain)

Betreuer: Professor Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann
Dr. Ralph Büchler

**VERSUCHE ZUR EIGNUNG VERSCHIEDENER PUFFER
BEI DER INSTRUMENTELLEN BESAMUNG DER BIENENKÖNIGIN
(*Apis mellifera*)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
WIEBKE KEINER-STOEHR
Tierärztin aus Aßlar

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Professor Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. F. Kaleta

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2004

Meinen Eltern,
Frau C. Stöhr, geb. Steinhard
und Herrn Dr. F. K. Stöhr †
in liebevollem Gedenken

„die auf den Herrn harren,
kriegen neue Kraft “

Jesaja 40,31

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einführung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Exkurs in die Biologie, Morphologie und Physiologie von Drohnen-Spermien.....	3
2.2 Die Technik der Spermagewinnung bei den Drohnen.....	6
2.3 Vor- und Nachteile der klassischen Besamung vs. Spermamischtechnik.....	7
2.4 Die Wahl der Verdünnerlösung und ihre Auswirkung auf die Sperma-Motilität.....	10
2.5 Untersuchung des Spermas	12
2.6 Untersuchung des Füllungsgrades der Spermatheka.....	14
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Versuchsdesign.....	16
3.2 Verwendete Bienen.....	17
3.2.1 Drohnen.....	17
3.2.2 Königinnen.....	18
3.3 Gewinnung von Bienensperma.....	19
3.4 Vorbereitung des Spermas zur instrument. Besamung.....	21
3.5 Instrumentelle Besamung der Königinnen.....	22

3.6 Kontrolle der besamten Königinnen.....	24
3.6.1 Kontrolle der Eiablage.....	24
3.6.2 Kontrolle des Bruterfolges.....	25
3.7 Präparation der Spermatheka.....	27
3.7.1 Anzahl der Spermien in der Spermatheka.....	27
3.8. Erfassung der anderen Zielgrößen.....	30
3.8.1 Anfangsaktivität/Motilität.....	30
3.8.2 Identifizierung toter Spermien mittels Fluoreszenzfärbung.....	32
3.8.2.1 Untersuchungen des Frischspermas.....	32
3.8.2.2 Untersuchungen des Spermathekeninhalts.....	35
3.8.3 Hypoosmotischer Schwelltest.....	35
3.8.3.1 Untersuchungen des Frischspermas.....	39
3.8.3.2 Untersuchungen des Spermathekeninhalts.....	40
3.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	40
3.10 Reagenzien und Materialien.....	41
4 Ergebnisse	45
4.1 Anfangsaktivität.....	45
4.1.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	45
4.1.2 Untersuchung des Frischspermas.....	47
4.2 Motilität.....	47
4.2.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	48
4.2.2 Untersuchung des Frischspermas.....	49
4.3 Erfassung der toten Spermien mittels Fluoreszenzfärbung	50
4.3.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	50

4.3.2 Untersuchung des Frischspermas.....	51
4.4 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS).....	52
4.4.1 Gerollter hinterer Schwanz-Bereich (HSB).....	52
4.4.1.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	52
4.4.1.2 Untersuchung des Frischspermas.....	54
4.4.2 Gerollter vorderer Schwanz-Bereich (VSB).....	54
4.4.2.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	54
4.4.2.2 Untersuchung des Frischspermas.....	55
4.4.3 Gerollter mittlerer Schwanz-Bereich (MSB).....	56
4.4.3.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	56
4.4.3.2 Untersuchung des Frischspermas.....	57
4.4.4 ORW (Osmotischer Resistenzwert).....	58
4.4.4.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	58
4.4.4.2 Untersuchung des Frischspermas.....	59
4.4.5 Gefaserter mittlerer Schwanz-Bereich (gefMSB).....	60
4.4.5.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	60
4.4.5.2 Untersuchung des Frischspermas.....	61
4.4.6 Gefaserter vorderer Schwanz-Bereich (gefVSB).....	62
4.4.6.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts.....	62
4.4.6.2 Untersuchung des Frischspermas.....	63
4.5 Anzahl der Spermien in der Spermatheka.....	64
4.6 Dauer bis zum Beginn der Eiablage.....	66
4.7 Brutentwicklung.....	67
4.8 Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse.....	70

4.9 Korrelationsanalysen	72
4.9.1 Spermatheka-Spermien: Anfangsaktivität und Motilität	72
4.9.2 Spermatheka-Spermien: Lebende Spermien und Gesamt- motilität, Spermathekafüllung und Dauer bis zur Eiablage	73
4.9.3 Dauer bis zum Eiablagebeginn und Spermathekafüllung	74
5 Diskussion	75
5.1 Diskussion der Methodik	76
5.1.1 Allgemeine Verfahren und Versuchsaufbau	76
5.1.2 Verfahren zur Beurteilung der Spermienqualität	77
5.1.2.1 Anfangsaktivität und Motilität	77
5.1.2.2 Lebend-Tot-Färbung	78
5.1.2.3 Hypoosmotischer Schwelltest	78
5.1.2.4 Auszählung der Spermien	79
5.2 Diskussion der Ergebnisse	79
5.2.1 Ergebnisse bei Untersuchung von Frischsperma	79
5.2.2 Ergebnisse bei Untersuchung des Spermatheka-Inhaltes	79
5.2.2.1 Anfangsaktivität und Motilität	79
5.2.2.2 Anteil lebender Spermien	80
5.2.2.3 Hypoosmotischer Schwelltest	81
5.2.3 Ergebnisse der anderen Zielgrößen	82
5.2.3.1 Füllung der Spermatheka	82
5.2.3.2 Dauer bis zum Beginn der Eiablage	82
5.2.3.3 Brutentwicklung	83

6 Zusammenfassung	84
7 Summary	86
8 Literaturverzeichnis	87
9 Anhang (mit Abkürzungsverzeichnis).....	97

1 Einführung

Seit 1987 wird im Hessischen Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz (HDLGN), Bieneninstitut Kirchhain, routinemäßig die von MORITZ (1983) entwickelte Spernamischmethode (s. Kap. 2.2, S. 6) zur instrumentellen Besamung verwendet. Dabei fiel auf, dass so besamte Königinnen im Vergleich zu konventionell besamten eine niedrigere Lebenserwartung hatten. Diese lag meist unter zwei Jahre im Vergleich zu sonst bis zu 5 Jahren. Auch hatten die Völker dieser Königinnen eine Tendenz zu frühzeitiger Umweiselung (die Ablösung der alten Königin durch eine im Volk gezogene junge Königin) und zeigten einen nicht optimalen Füllungsgrad der Spermatheka. Es ist nicht bekannt, ob dies dadurch zu begründen ist, dass eine schnellere Spermatheka-Entleerung erfolgt, eine Unfruchtbarkeit der Spermien durch mechanische, chemische oder physikalische Einflüsse vorliegt oder der Füllungsgrad der Spermatheka - durch die instrumentelle Besamung bedingt - nicht ausreichend ist.

Ein möglicher Faktor für die o. g. Tendenzen ist der verwendete Puffer zur homogenen Durchmischung der kompakten Spermapakete. Die Ergebnisse eines im Sommer 1999 gelaufenen Vorversuchs bestärkten diese Überlegungen. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, die Auswirkungen verschiedener Verdünner sowohl auf die Vitalität der Spermien und deren Einlagerung in die Spermatheka als auch die spätere Befruchtung von Eiern zu überprüfen.

Als Verdünner wurden der herkömmlich verwandte Tris-Puffer gegen einen Phosphat-Puffer nach Sorensen sowie, im Vergleich zu beiden Puffern, mit Eigelb-Zusatz ausgetestet. Dieser Eigelb-Zusatz wird bisher nur bei der Aufbereitung von Säugetierspermien bei der Kühl- und Kryokonservierung verwendet. In Ergänzung dazu wurden die so behandelten Spermien einmal etablierten Untersuchungen – wie der Überprüfung der Motilität - und andermal noch nicht bei Bienen-Sperma angewandten Untersuchungen – wie z. B. der Lebend-Tot-Färbung mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffs HOECHST 33258 (Bisbenzimid) und dem

Hypoosmotische Schwelltest (HOS) – unterzogen. Diese neuen Untersuchungen wurden auf ihre Tauglichkeit überprüft.

2 Literaturübersicht

2.1 Exkurs in die Biologie, Morphologie und Physiologie von Bienenspermien

Das Geschlecht einer Biene wird durch eine Reihe von Allelen auf einem einzelnen Gen-Lokus bestimmt. Genetisch gesehen haben die Drohnen einen haploiden (einfachen) Chromosomensatz und demzufolge normalerweise nur ein Sex-Allel (Gen, das für das Geschlecht ausschlaggebend ist; hier X_i oder X_k genannt).

Die Königinnen und Arbeiterinnen dagegen sind in ihrem Chromosomensatz diploid und in ihren Sex-Allelen heterozygot ($X_i X_k$). Das eine Allel stammt also von der Königin-Mutter, das andere vom befruchtenden Drohn (PAGE und LAIDLAW, 1982).

Die Königin kann bei der Eiablage durch Abtasten der Zellengröße erfassen, welche Bienenfraktion in dieser aufgezogen werden soll. Ist es eine relativ kleine Zelle, so legt sie ein befruchtetes Ei hinein, aus dem sich eine Arbeiterin entwickelt; ist die Zelle relativ groß, so wird sie mit einem unbefruchteten Ei bestückt, aus dem sich ein Drohn entwickelt. Durch gezielte Anspannung der Abdominalmuskulatur kann sie steuern, ob das von ihr gelegte Ei befruchtet sein soll oder nicht und damit wählen, welches Geschlecht die sich entwickelnde Biene haben soll.

Wenn aber die Sex-Allele von Königin-Mutter und befruchtendem Drohn zu ähnlich sind, entsteht ein Drohn mit einem diploiden Chromosomensatz und homozygoten Sex-Allelen ($X_i X_i$ oder $X_k X_k$). Diese diploiden Männchen werden von den Arbeiterinnen noch vor der Entwicklung zu Bienen-Maden erkannt und ausgefressen. Es entstehen Brutlücken in der mit Eiern bestückten (bestifteten) Wabe mit daraus resultierender schlechter Volksentwicklung. Dies ist die große Gefahr des Inzuchteffektes in geschlossenen Populationen (PAGE und LAIDLAW, 1982, 1983, 1985).

Ein Bienenspermium besitzt in seiner gestreckten Form eine Länge von 250-270 μm und eine Breite von 0,7 μm . Der akrosomale Komplex an der Spitze des Spermiums hat eine Länge von 5 μm . Die akrosomale Ausweitung am Ende des Akrosoms wird „Galea“ genannt und geht in die Kernzone des Spermiums über (s. Abb. 1).

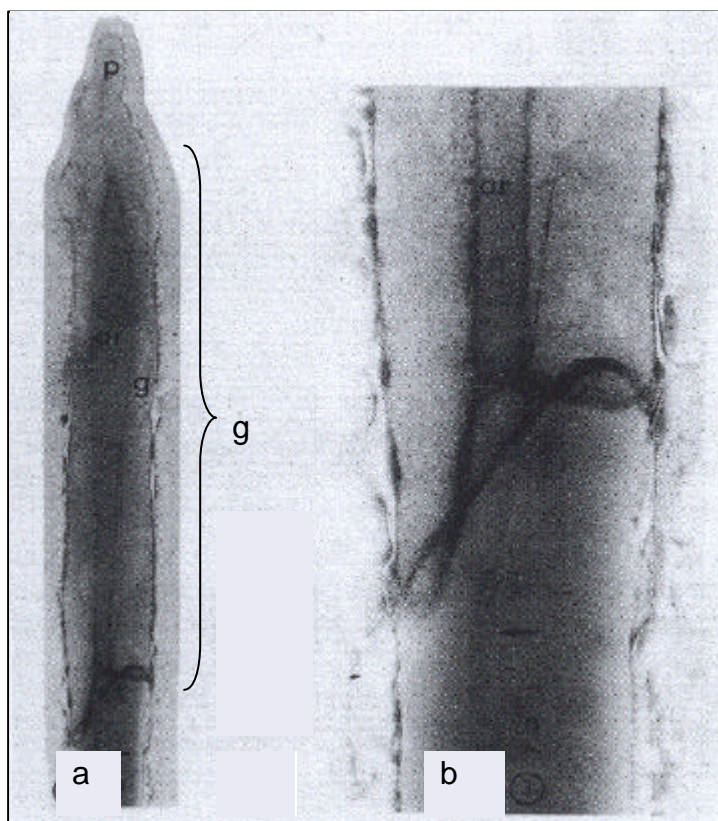


Abb. 1: Negativ-Kontrastierung,
a) Details des akrosomalen Komplexes (Vergr. x 7000)
 p = Spitze des Akrosoms
 g = Galea
b) Akrosomal-nuclearer Übergang (Vergr. x 13500)

nach Lensky et al. (1979)

An den Kern (Nucleus), der 5 μm lang und 0,5 μm breit ist, schließen sich 2 langgestreckten Mitochondrien-Derivate mit einer Länge von ca. 200 μm zur Energieversorgung des Spermiums und das filamentöse Axonem zur Stabilisierung an (JAMIESON, 1987; s. auch Abb. 2).

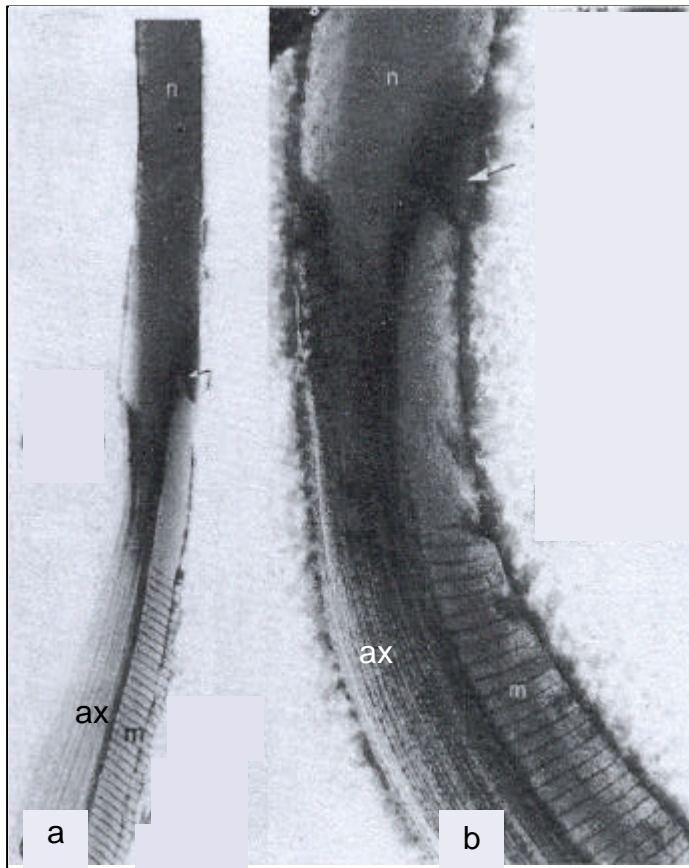


Abb. 2: Negativ-Kontrastierung eines Bienenspermiums:

a) Kern und vorderer Teil des Schwanzes (Vergr. x 6400)

b) Übergang zwischen Nucleus und Schwanz (Vergr. x 16000)

**n = Nucleus
m = Mitochondrium
ax = Axonem**

nach Lensky et al. (1979)

Aufgrund dieser langgestreckten Form wird das Spermium in eine akrosomale Zone, die Kernzone und den Schwanz untergliedert.

Drohnen-Spermien bewegen sich mithilfe von s- oder schraubenförmigen Bewegungen ihres Schwanzes vorwärts (INFANTIDIS, 1972).

Sie haben die Bestrebung, sich mit den Köpfen an Flächen anzulagern. Bei einem Fehlen solcher Flächen liegen sie Kopf an Kopf (RUTTNER, 1956) in sich voneinander unabhängig bewegenden Bündeln (LENSKY und SCHINDLER, 1967) und üben so eine wellenförmige Massenbewegung aus.

Die Fähigkeit zur Bewegung der Spermien in Flüssigkeiten wird als Parameter zur Qualitätsuntersuchung gesehen, da eine ausreichende Motilitätsrate bei Säugetierspermien als Voraussetzung für die Migration zur Eizelle und die Penetration der Eihüllen gilt. Die Art und Stärke der Motilität ist jedoch tierartlichen Besonderheiten unterworfen und nicht zwingend mit der Befruchtungsrate korreliert (BUSCH et al.1991).

2.2 Die Technik der Spermagewinnung bei den Drohnen

Die verschiedenen Besamungsstationen für Bienen verwenden unterschiedliche Methoden zur Gewinnung von Drohnen-Sperma. Der Kopf des Drohns wird durch Drehen vom Körper getrennt und der Drohn so getötet.

LAIDLAW (1977) zeigt, dass der Thorax des geschlechtsreifen, getöteten Drohns vorsichtig zwischen Daumen und Zeigefinger zu rollen ist. Infolge dieses Reizes stülpt der Drohn sein Begattungsorgan aus und „präsentiert“ das Sperma auf einem Mukustropfen, so dass es relativ leicht abzunehmen ist. Auch WOYKE (1985) beschreibt das Handling der Drohnen, bei der das Sperma mit Hilfe einer Kapillare aufgesogen und so vom Schleim getrennt wird.

KAFTANOGLU und PENG (1980) verwenden eine Waschmethode, um das Sperma vom Mukustropfen zu lösen. Dabei wird der evertierte Endophallus des Drohns in einen Verdünner getaucht und vorsichtig abgeschabt. Der Schleim wird vom Sperma durch Zentrifugation getrennt.

Im Kirchhainer Hessischen Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz (HDLGN) wird die von SCHLEY (1994) propagierte Methode der Spermaaufnahme unter Verwendung einer von SCHNEIDER im Kirchhainer Bieneninstitut umgebauten MACKENSEN-Spritze angewandt.

2.3 Vor- und Nachteile der Spermamischtechnik gegenüber der natürlichen Paarung und der klassischen Besamung

Die Bienenkönigin paart sich natürlicherweise hoch in der Luft. Wie viele Drohnen an ihrer Begattung beteiligt sind, ist eine bis jetzt ungeklärte Frage. Ursprünglich ging man von einer Paarung der Königin mit einem Drohn aus (BISHOP, 1920). Eine artspezifische Paarung mit 6 bis 17 Drohnen wurde anschließend propagiert (PEER, 1956; TABER und WENDEL, 1958, WOYKE 1962, 1975; KERR et al. 1962; RUTTNER et al. 1978; ADAMS et al. 1977).

Erst unter Verwendung einer Paarungskammer wurde die genaue Beobachtung des Paarungsverhaltens möglich (HARBO, 1971; ROSSIGNOL, et al., 1993).

Nach ESTAUP et al. (1994) variiert die Anzahl der Paarungen je nach Rasse. Sie ermitteln die Anzahl der befruchtenden Drohnen mithilfe von DNA-Isolation (mittels PCR) und DNA-Analyse der Sex-Allele. Die Rassen *Carnica* und *Ligustica* paarten sich demnach bei ihren Untersuchungen mit 19 bzw. 20 mal am häufigsten.

Die aufgenommenen Spermien werden bis in die Eileiter gepresst und von da aus in die Spermatheka aufgenommen, wo sie gespeichert werden. Dieser Vorgang wird durch Kontraktionen der Abdominal-Muskulatur der Königin einerseits und durch aktives Einwandern der Spermien andererseits gefördert und ist nach 24 Stunden nahezu abgeschlossen (RUTTNER, 1954, 1956; GESSNER und RUTTNER, 1977; s. Abb. 3 und auch Abb. 7, S. 23).

Nach von WILLIAMS und HARBO (1982) durchgeführten Untersuchungen erreicht verdünntes Sperma genauso gut die Spermatheka wie unverdünntes.

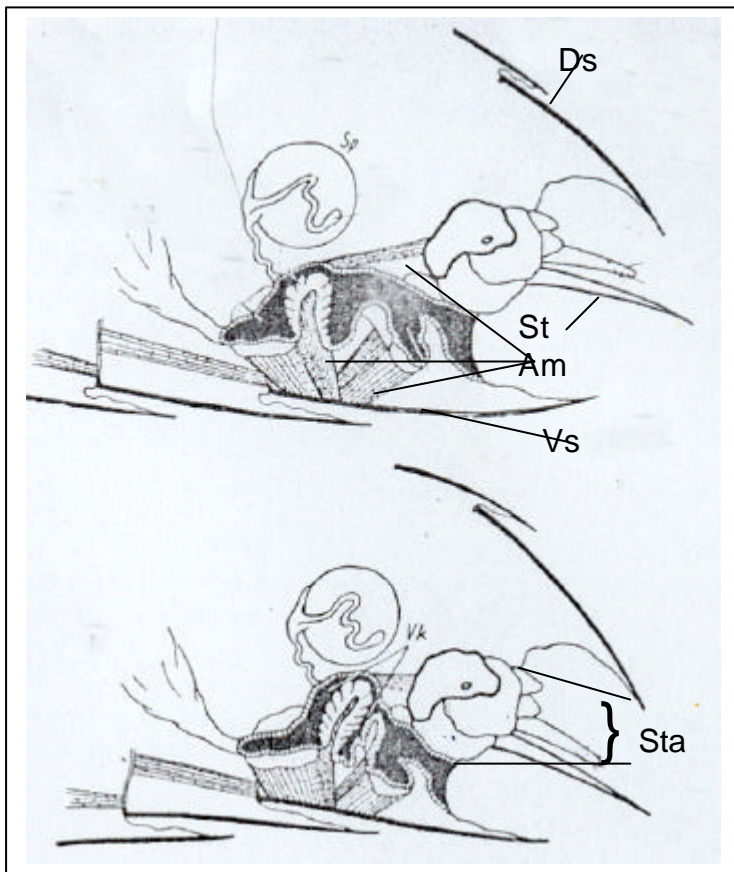


Abb. 3: Zur Funktion der Spermapresse;
aus RUTTNER (1956):
Zur Frage der Sperma-
Übertragung bei der
Bienenkönigin, S. 254

Legende zu Abb. 3:

Am = Abdominal-
muskulatur
Ds = Abdominalschuppe
Sp = Spermatheka
St = Stachel
Sta = Stachelapparat
Vk = Vaginalklappe
Vs = Ventralschuppe

Die pH-Differenz zwischen dem Ejakulat (pH 6,2) und dem Spermathekamilieu (pH um 9,2) regt die Spermien zum Einwandern in die Spermatheka an (VERMA, 1973a; CAMARGO, 1975). Je nach Bedarf werden sie von da aus den Eiern über einen gemeinsamen Ausführungsgang der Spermatheka und der Eierstöcke bei der Eiablage zugegeben.

KAFTANOGLU und PENG (1982) stellen fest, dass natürlich begattete Königinnen am schnellsten in Eilage gehen und eine weitaus stärker gefüllte Spermatheka besitzen als die instrumentell besamten Königinnen. Zu dem gleichen Ergebnis gelangt HARBO (1986). Er führt dies und das niedrigere Gewicht der instrumentell besamten Königinnen auf die bei der künstlichen Besamung gebräuchliche CO₂-Begasung zurück. Für eine schnellere Eiablage vorteilhaft beschreiben EBADI und GARY, 1980, eine zweifache CO₂-Begasung während der Insemination und 24 Stunden danach.

Es ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt, ob die Paarungsreihenfolge für den mengenmäßigen Anteil des Spermas, das in die Spermatheka gelangt, relevant ist. WOYKE (1963) findet bei seinen Untersuchungen Unterschiede in der Spermafraktion verschiedener Drohnen in der Spermatheka, kann aber keine eindeutige Aussage machen, welcher Drohn die jeweils höchste Spermafraktion in der Spermatheka bestimmt. LAIDLAW und PAGE (1984) können in ihren Untersuchungen keinen Effekt der Besamungsreihenfolge nachweisen.

Diese früheren Untersuchungen basieren auf den phänotypischen Merkmalen der Nachkommenschaft eines Drohns. Sie wurden inzwischen von genanalytischen Methoden abgelöst. Nach HABERL (1993) wird die Tendenz bei besamten Königinnen deutlich, dass Sperma, das später in die Königin gelangt, einen höheren Nachkommenschaftsanteil stellt, woraus auf unterschiedliche Qualitäten der einzelnen Spermaportionen geschlossen wurde. Neuere Untersuchungen an Zwergbienen-Königinnen stellen diese These jedoch in Zweifel (SCHLÜNS et al. 2002).

Der große Nachteil bei der freien Paarung aus Sicht der Züchter ist die nicht kontrollierbare Partnerwahl, die eine gezielte Anpaarung unmöglich macht.

Daher wurde schon früh versucht, Königinnen mit dem Sperma von ausgewählten Drohnen künstlich zu besamen (MACKENSEN, 1964, 1969).

Eine Weiterentwicklung ist die von MORITZ (1983) vorgestellte Methode, bei der das Sperma mehrerer Drohnen vor der Versamung gemischt wird (Spermamischmethode). Diese Methode basiert auf der bei der Spermawaschmethode von KAFTANOGLU und PENG (1980) angewandten Zentrifugation des Spermas.

Bei der MORITZ'SCHEN Spermamischtechnik werden 16 µl Sperma in 300 µl Kiev-Verdünner gegeben und bei 10 000 g für 10 Min. zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstandes wird das Mischsperma zur instrumentellen Besamung verwendet. Jede Königin wurde mit 4 µl des Mischspermas besamt. Mit dieser Methode konnte eine gute und homogene Durchmischung des sonst in sehr kompakten Bündeln liegenden Spermas ausgewählter Drohnen erreicht werden.

Der große Vorteil besteht darin, dass dadurch eine einheitliche Mischung des Spermas ausgewählter Drohnen ermöglicht wird.

Gleichzeitig können definierte Anteile an Drohnen-Sperma verwendet und die Anzahl von Drohnen-Vätern beliebig gewählt werden.

Dies ist ein vorteilhaftes Ausleseverfahren, bei dem beliebig viele Königinnen gleich angepaart werden können, wie das z. B. bei Zuchtleistungsprüfungen erforderlich ist.

Ein Vorteil der Spermamischmethode liegt auch darin, die Drohnen so zur Besamung auszuwählen, dass eine relative Begrenzung des Inzuchteffektes (s. Kap. 2, S. 3) möglich wird.

2.4 Die Wahl der Verdünnerlösung und ihre Auswirkung auf die Sperma-Motilität

Es liegen zahlreiche Berichte über das Verhalten von Spermien bei Konfrontation mit diversen Flüssigkeiten vor.

Primär geht es bei diesen Versuchen darum, brauchbare Medien für die Spermalagerung zu definieren.

MCLAIN ist 1886 der erste, der Verdünnerlösungen für Bienensperma verwendet. Er verdünnte Bienensperma mit einem Tropfen Glycerin und warmen Regenwasser.

Die von JAYCOX (1960) getesteten Flüssigkeiten reichen nur zu einer Spermalagerung von ca. 6 Stunden. Infrage kommen Verdünner mit Dextrose- und Glycerinzusätzen. Für längere Spermalagerung wird ein Verdünner mit Bakterieninhibitor empfohlen. JAYCOX (1960) zeigte weiterhin, dass unverdünntes Sperma nach ca. 60 Minuten inaktiv wird.

Nach LENSKY und SCHINDLER (1967) wird die Beweglichkeit der aus der Spermatheka entnommenen Spermien durch Zugabe von Phosphat-Puffer (pH 7,1), Veronal (pH 8,6), Glycerin-NaOH (pH 9,0), Citrat (pH 4,3) und Bicarbonat

(pH 8,7) gesteigert. Selbst durch eine Zugabe von Aqua dest. ist eine starke Beweglichkeit auszulösen, die aber innerhalb kurzer Zeit aufhört. Die Autoren folgern daraus, dass der pH der Lösung unerheblich ist, jedoch eine Abhängigkeit der Sperma-Motilität von der Lagertemperatur besteht.

VERMA (1973b) gibt an, dass die Motilität der Spermien durch K^+ - und Na^+ -Zusätze reversibel aktiviert werden kann.

Kokosnussmilch ist nach CAMARGO (1975) ein geeignetes Medium, um Drohnenspermien zu lagern. Nach seinen Untersuchungsergebnissen ist die pH-Differenz zwischen dem Samen (pH 6,2) und der Spermathekaflüssigkeit (pH um 9,2) für eine chemotaktische Migration der Spermien verantwortlich (pH-Werte von BRAUSSE, 1989).

Bei Säugetierspermien zeigte WATSON schon 1976, dass die aktive Komponente des Eigelbs zum Schutz der Spermien, welches zur Kryokonservierung dem Sperma zugesetzt wurde, in einem Lipoprotein niedriger Dichte besteht.

POOLE und TABER (1969) setzten dem Drohnensperma verschiedene Antibiotika zu. Nach der instrumentellen Besamung entwickelte sich bei der Gruppe mit dem Zusatz von Streptomycin die meiste Arbeiterinnenbrut.

VERMA (1978) testete verschiedene Verdünner, unter anderem Eber-Sperma-Verdünner, Bullen-Sperma-Verdünner, Kokosnusswasser und Tris-Puffer. Neun Monate nach Insemination und Rückgewinnung aus der Spermatheka waren die mit Tris-Puffer (pH 7,19) und Tris-Puffer mit Aminosäurezusatz vermischten Spermien am beweglichsten.

POOLE und Edwards (1971) suchten nach motilitätsfördernden Zuckern und empfahlen die Zugabe von Glukose, Fruktose, Galaktose, Maltose, Melibiose oder Trehalose.

Auch MACKENSEN (1969) überprüfte verschiedene Verdünner bei unterschiedlichen Lagertemperaturen und hatte den größten Erfolg bei der instrumentellen Besamung mit einer NaCl-Lösung mit verschiedenen Zuckerzusätzen und bei einer NaCl-Lösung mit K_2HPO_4 -Puffer bei einer Lagertemperatur von 25° C bis zur Insemination.

In weiterführenden Untersuchungen von MORITZ (1984) mit der Spermamischmethode, in der Parameter wie Eilagebeginn, Brutbild und die Volksentwicklung erfasst wurden, schnitt ein Tris-Puffer mit pH 8,7 am besten ab.

Eine Langzeitstudie über die Volksentwicklung bei instrumentell besamten Königinnen fehlt jedoch bisher. Im Hinblick auf die relativ hohen Ausfallquoten der Königinnen in den ersten zwei Jahren nach der Besamung mit der Spermamischmethode (BÜCHLER 1997, pers. Mitteilung) erscheint eine Überprüfung der Verdünner auf Verträglichkeit geboten.

In der vorliegenden Untersuchung sollte daher der von KAHN (pers. Mitteilung) vorgeschlagene Sorensen-Phosphat-Puffer (pH 7,2) im Vergleich zu dem üblichen Trispuffer (pH 8,7) überprüft werden.

Bei Säugetierspermien ergab sich mit dem Zusatz von Eigelb zum Spermaverdünner ein Durchbruch bei der Kühl- und Kryokonservierung.

Nach BUSCH et al. (1991) enthält frischer Dotter von Hühnereiern einen Lipoid-Protein-Komplex, der an den Spermien ein Schutz-Kolloid bildet. Dadurch werden diese widerstandsfähiger gegen extrazelluläre Einflüsse, was möglicherweise auch bei den langen Lagerungszeiten von Bienensperma in der Spermatheka vorteilhaft sein kann. Für Säugetierspermien sind daher Anteile von 8-15% Eidotter in der Verdünnerlösung für die Kryokonservierung üblich. Die Spermienbeweglichkeit wird durch den Eidotterzusatz allerdings eingeschränkt und der Stoffwechsel herabgesetzt. Auch kann beim Abbau von im Dotter enthaltenen Aminosäuren spermienschädigendes H_2O_2 entstehen.

2.5 Untersuchung des Spermas

FISCHER (1989) untersuchte Bienen-Frischsperma und zur instrumentellen Besamung vorbereitetes Mischsperma; Kriterien waren die Anfangsaktivität, die Motilität 2 Minuten nach Mischen mit dem Verdünner, Aussehen, Dichte, pH-Wert und Lagerfähigkeit. Zur Dichte-Bestimmung des Spermas benutzte sie dabei eine Bürker-Zählkammer und färbte die Spermien mit einer Methylenblau-Lösung an, um sie unter dem Mikroskop besser darstellen zu können. OEHM und SCHLEY (1992) färbten Bienenspermien mit Giemsa-Farblösung an.

Da für Bienensperma keine Lebend-Tot-Färbung wie die bei Haussäugetieren gebräuchliche Supravitalfärbung mit Eosinlösung bekannt ist, versuchte man mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen eine Schätzung der Prozentzahl lebender Spermien in einer Probe zu erreichen, wobei dies erneut in Anlehnung an die bei Säugetierspermien gebräuchlichen Methoden erfolgte. Dort kamen mehrere Verfahren zur Anwendung.

So verwendeten z. B. zur Beurteilung von Humanspermien CROSS et al. (1986) eine Fluoreszenzfärbung mit dem Farbstoff HOECHST 33258 (Bisbenzimid), durch den tote Spermien angefärbt wurden. HARRISON und VICKERS (1990) verwendeten Carbofluorescein Diacetat und Propidium-Iodid als Indikator für die membrangeschädigten und damit toten Spermien von Schafbock und Eber.

PINTADO et al. (2000) verwendeten Propidium-Iodid und Bisbenzimid zur Markierung toter Bullenspermien.

RIESENBECK et al. (2001) beurteilten Rüdenspermien, indem sie unter anderen Qualitätsparametern die Vitalität und akrosomale Integrität der Spermien mit dem Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33258 (Bisbenzimid) und mittels FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) gekoppelten Pisum Sativum-Lektin darstellten. Auch der von JEYENDRAN et al. (1984) für Humansperma zur Darstellung der Membranintegrität beschriebene Hypoosmotische Schwelltest (HOS) wurde von RIESENBECK et al. (2001) als für Hundespermien verwendbar erachtet. Bei diesem

Test werden die Spermien in ein hypotones Medium verbracht. Intakte Spermien reagieren nach einer gewissen Zeit infolge der Wasseraufnahme durch eine Schwellung des Kopfes und eine Aufrollung des Schwanzes. Ist die Spermium-Membran nicht intakt, ist das Spermium auch zu keiner Osmose fähig und reagiert nicht.

Im Gegensatz zu der Fülle an Angaben für Säugetierspermien fanden sich für Bienenspermien zu dem Zeitpunkt der Versuche in der Literatur nur wenige Angaben.

BACKES (1989a, 1989b) berichtet über einen Versuch Bienensperma mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs anzufärben. Ziel war eine kontrastreichere Darstellung der Spermien bei Erfassung der Dichte; verwendet wurde der Farbstoff MG 530, Nr. 33258, der allerdings als nicht geeignet bezeichnet wurde.

1990 erprobten LOCKE et al. eine Kombination der Fluoreszenz-Farbstoffe Propidium-Iodid und Hoechst 33342 – einem Bisbenzimidazol-Derivat, das die DNA der Nuclei toter und lebendiger Spermien blau anfärbt – an Drohnensperma und ermittelten die geeignetsten Farbstoff-Konzentrationen. Propidium-Iodid dringt durch die defekte Membran toter Spermien ein und färbt deren Kern-DNA rot.

Parallel zu den eigenen Untersuchungen testeten COLLINS und DONOGHUE (1998) den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-14 mit Propidium-Iodid und den Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM mit Propidium-Iodid bei Bienensperma aus und erachteten den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-14 (grün) mit Propidium-Iodid als geeignet zur Abgrenzung lebendiger von toten Spermien.

2.6 Untersuchung des Füllungsgrades der Spermatheka

Mit Hilfe der Erfassung des Spermatheka-Diameters wurde deren Volumen von WOYKE und JASINSKI (1973) bestimmt. Untersuchungen zum Füllungsgrad der Spermatheka liegen von LENSKY und SCHINDLER (1967) vor; sie drückten die

Spermatheka zwischen Glasplättchen zusammen und beobachteten das austretende Sperma.

Zu natürlich begatteten Königinnen liegen die Zahlen der Spermatheka-Füllung unter anderem durch MACKENSEN (1959), WOYKE (1962) und KAFTANOGLU und PENG (1980) vor. Angaben zu der Füllung instrumentell besamter Königinnen machen WOYKE (1962), MACKENSEN (1964), BOLTEN und HARBO (1982) und KAFTANOGLU und PENG (1980).

BOLTEN und HARBO (1982) beurteilten auch das Fassungsvermögen der Spermatheka, indem sie über Insemination mit vielen kleinen Spermaportionen eine definierte Menge einbrachten.

FISCHER (1989) untersuchte den Füllungsgrad der Spermatheka der besamten Königinnen, indem sie die Spermatheka freipräparierte, sie in modifizierter Ringer-Lösung zerdrückte und die Spermiedichte mithilfe der Bürker-Zählkammer ermittelte.

Im Rahmen von Vorversuchen bestätigte sich die Eignung der Bürker-Zählkammer zur Auszählung der Spermien, welche die Spermatheka erreicht haben (s. Abb.13, S. 29 und Abb. 42 im Anhang).

3 Material und Methoden

Um möglichst optimale Versuchsbedingungen herzustellen, war es wichtig, die Versuche an genotypisch weitgehend ähnlichen Königinnen durchzuführen. Dieser Forderung wurde durch Verwendung von eigens in der HDLGN gezogenen Schwesternköniginnen genüge getan; dadurch konnte von gleichen Bedingungen für die Königinnenaufzucht ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurde auch das Sperma von Drohnen eines in der HDLGN aufgezogenen Volkes gewonnen. Dadurch war allerdings die Anzahl der Königinnen und die Menge des zur Verfügung stehenden Spermas begrenzt, was eine optimale Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Bienen (abgesehen von dem Tierschutzgedanken möglichst wenig Tiere für einen Versuch zu verwenden) bedingte.

3.1 Versuchsdesign

Im durchgeführten Versuch waren die Testvariablen die Art des verwendeten Puffers (Trispuffer vs. Phosphatpuffer), einmal mit und einmal ohne Eidotterzusatz (s. Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppe	Puffer	Eidotterzusatz	pH-Wert	Königinnen n
1	Tris	-	8,7	24
2	Phosphat	-	7,2	17
3	Tris	+	8,7	20
4	Phosphat	+	7,2	13

An der Spermatheka entnommenem und an frischem, zur instrumentellen Besamung vorbereitetem Sperma ergaben sich folgende Zielgrößen :

- Sperma-Motilität (untergliedert in Anfangsaktivität und Motilität zwei Minuten nach Überschichtung mit Pufferlösung; [0-4 Pkt.])
- Identifizierung lebender Spermien mittels Fluoreszenzfärbung (%)
- Hypoosmotischer Schwelltest (HOS) mit den Kriterien vorderer aufgerollter Schwanz-Bereich (VSB), mittlerer aufgerollter Schwanz-Bereich (MSB) und hinterer aufgerollter Schwanz-Bereich (HSB) – (alles in %) - und dem daraus resultierenden Osmotischen Resistenzwert (ORW [0-100 Pkt.]

Weitere Zielgrößen waren:

- Die Dauer von der Besamung bis zum Beginn der Eiablage (in Tagen)
- Brutentwicklung (hier Völker n = insgesamt 30, s. Kap. 3.6.2, S. 25)
- Anzahl der Spermien in der Spermatheka (8-9 Wochen nach der instrumentellen Besamung; in Mio./ μ l)

3.2 Verwendete Bienen

3.2.1 Drohnen

Die zur Spermaentnahme verwendeten Drohnen war eigens für diesen Versuch im HDLGN gezogen worden. Es wurden nur Drohnen der Rasse *Carnica* verwendet. In einem Drohnenträgervolk werden in der Regel Drohnen von drei bis sechs verschiedenen Drohnenmüttern, die Halb-Schwestern sind, aufgezogen.

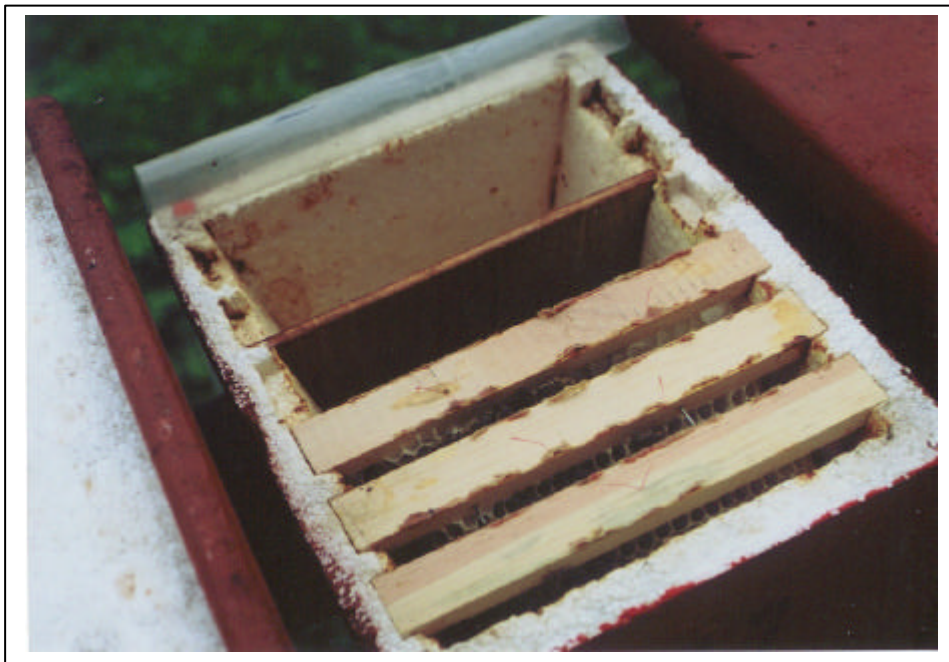
Die Drohnenbrut wird in Honigräume über Absperrgitter gegeben, um Zuflug fremder Drohnen zu vermeiden. Durch ein Loch im Deckel können sie nach vollendeter Entwicklung gut abgefangen werden. Die Drohnen sollten zur

Entnahme von Sperma mindestens 16 Tage alt sein (Darstellung des Drohnenträgers s. Anhang Abb. 38 und 39).

3.2.2 Königinnen

Die für diesen Versuch verwendeten Königinnen wurden ebenfalls im HDLGN aufgezogen und stammten von den Rassen *Carnica* und *Buckfast* ab.

Jede der Königinnen wurde für die Dauer des Versuchs in ein Kirchhainer Begattungs-Kästchen (KBK) mit einem Staat von ca. 1200 Arbeiterinnen gegeben (eingeweiselt). Ein KBK besteht aus einer Styropor-Kiste mit Deckel, die in zwei Räume aufgeteilt ist, dem Futter- und dem Wabenraum (s. Abb. 4).



**Abb. 4: Kirchhainer Begattungs-Kästchen (KBK):
Einteilung in Futterkammer (hinten) und Wabenraum**

Im Wabenraum können 4 Rähmchen eingebracht werden, an denen die Arbeiterinnen die Waben bauen können, in deren Zellen dann sowohl Futter gelagert als auch Eier gelegt werden.

Die mindestens 6 Tage alten Königinnen wurden einen Tag vor der Besamung gekäfigt und für 5 Minuten mit CO₂ begast, um den Beginn der Eiablage zu induzieren bzw. zu beschleunigen.

3.3 Gewinnung von Bienensperma

Vor der Entnahme der Drohnen aus dem Drohnenableger wurde der Arbeitsplatz, ausgestattet mit einem Mikroskop, einer Kaltlichtquelle und einem Stativ zum Anbringen der Besamungsspritze, vorbereitet. Dazu wurde eine sterilisierte (im Autoklaven bei 120° C und 1 bar für 20 Min.) Besamungsspritze mit steriler Pufferlösung (je nach Versuchsgruppe mit Tris- oder Phosphatpuffer) gefüllt und mit einer Glaskapillare mit sehr feiner aufgesetzter Pipettenspitze verbunden. Die Spritze wurde in ein Stativ unter einer Kaltlichtquelle gespannt und die Kapillare vollständig mit Pufferlösung gefüllt (s. Abb. 5).

Die dem Drohnenträger entnommenen Drohnen wurden bis zur Verwertung in einen Drohnenkäfig gesperrt, von wo sie einzeln entnommen werden konnten.

Zum Ausstülpen des Endophallus kann der reife Drohn durch Rollen und sanftes Drücken des Hinterleibes stimuliert werden. Mit dem Ausstülpen tritt wie bei der natürlichen Paarung der sofortige Tod ein. Das Sperma wird in Form einer kleinen Kugel auf dem Ende des Endophallus sichtbar. Unter dem Mikroskop wurde die Spermakugel nun in die Kapillare aufgenommen, wobei zwischen dem Puffer und dem Sperma ein Luftzwischenraum von ca. 3 mm eingehalten wurde, um einen Verdünnungseffekt des Spermas zu vermeiden.

Es wurde die benötigte Menge an Sperma von der entsprechenden Anzahl Drohnen aufgenommen.



Legende zu Abb. 5:
1= Stereo-Mikroskop
(15-20fache Ver-
größerung)
2= Besamungsspritze
mit
eingespannter Mikro-
Glaskapillare
3= Kapillaren-Spitze
mit
Spermasäule
4= Stativ

**Abb. 5: Geräteanordnung
zur Spermaaufnahme**

Nach Aufnahme der Spermasäule wurde wieder ein Luftzwischenraum gelassen und die Kapillare mit der Pufferlösung und einem Glasendstück mit Silikonadapter verschlossen.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kapillaren bei Zimmertemperatur über längstens 20 Stunden vor Sonnenlicht geschützt gelagert.

3.4 Vorbereitung des Spermas zur instrument. Besamung

Aus Kapazitätsgründen war es nur möglich, pro Besamungstag Mischsperma für je 2 Versuchsgruppen bereitzustellen.

Für die Gewinnung des Eidotters wurde die Schale des höchstens drei Tage alten Hühnereis mit Alkohol desinfiziert, sauber geöffnet und der Eidotter nach dem Durchstechen des Eiklars und der Dottermembran mit einer sterilen Eppendorf-Pipette entnommen. Das Verhältnis Eidotter zu Puffer lag bei 1:100, die Durchmischung erfolgte vorsichtig um Blasenbildung zu vermeiden. Unter Verwendung steriler Pipetten wurden Sperma und der jeweilige Puffer sorgfältig 1:10 gemischt. Die Spermaverdünnung (nach Anzahl der versamten Spermaportionen ca. 0,9-1,3 ml) wurde dann in ein Eppendorf-Hütchen mit einem Volumen von 1,5 ml verbracht, bei dem eine sterile 2-ml-Spritze ohne Spritzenkolben als Überlaufschutz diente (s. Abb. 6). Das Eppendorf-Hütchen wurde vorher über 20 Min. unter UV-Licht sterilisiert.

Das Sperma wurde in einer Heraeus Tischzentrifuge zweimal für 20 Min. bei bis zu 2500 UpM (entspricht 800 g) zentrifugiert. Dabei wurde die Zentrifuge jeweils langsam auf ihre Endgeschwindigkeit beschleunigt.

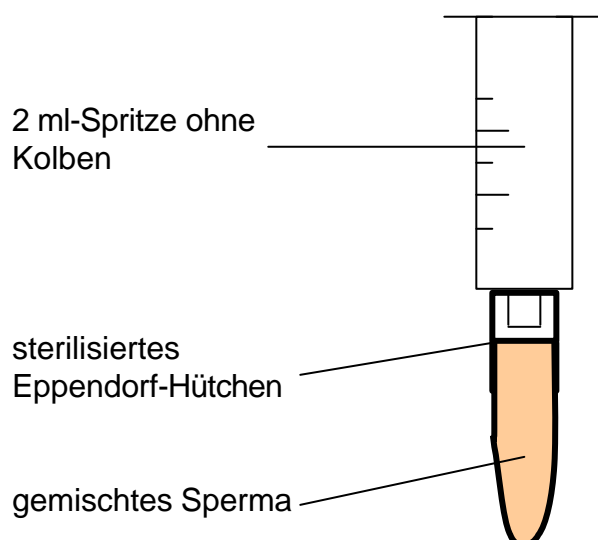


Abb. 6: Zum Zentrifugievorgang vorbereitetes Sperma im Eppendorf-Hütchen mit Spritzenaufsatz

Ein skaliertes Eppendorf-Hütchen diente als Kontrolle des Zentrifugationsvorgangs. Zeigte sich danach eine noch zu geringe Sedimentation des Spermas, wurden weitere Durchläufe von jeweils 5 Minuten angeschlossen, bis entsprechend der an der HDLGN vorliegenden Erfahrung die durch das skalierte Eppendorf-Hütchen angezeigte Sedimentation des Spermas ausreichend war. Der Phosphat-Verdünner benötigte i. d. R. einen Zentrifugengang mehr als der Tris-Puffer.

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Glas-Pipette mit feiner Spitze abgesogen und das Mischsperma-Pellet in eine Mikro-Glaskapillare mit einem Fassungsvermögen von ca. 60 µl aufgenommen. (Auch hier war es bei eidotterhaltigem Puffer nötig vorsichtig vorzugehen, um Blasenbildung zu vermeiden.) Diesem so vorbereiteten Sperma wurde eine Probe von ca. 25 µl entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt.

3.5 Instrumentelle Besamung der Königinnen

Die am Vortag mit CO₂ begasten (s. Kap. 3.2.2) und gekäfigten Königinnen wurden unter CO₂-Narkose nach der „Kirchhainer Methode“ besamt. Dazu wird die Königin in ein Plexiglasröhrchen verbracht, das als Königinnenhalter dient und in einem Winkel von ca. 80 Grad zur Bodenplatte angebracht wird.

Durch eine Verbindung mit einem Schlauch ist es möglich, das Narkosegas aus einer Druckflasche zuströmen zu lassen. Durch eine dem System zwischengeschaltete Waschflasche kann der Gaszustrom kontrolliert und mit einem Druckventil reguliert werden.

Wenn die Position der Königin in dem Königinnenhalter so korrigiert ist, dass sich ihre Rückenlinie auf der rechten Seite des Besamers befindet, wird der Geschlechtskanal mit Hilfe von zwei kleinen Häkchen rechts und links aufgespannt (Foto dazu: Abb. 40 im Anhang). Im rechten Häkchen befindet sich ein Loch, durch das der Stachel geführt wird.

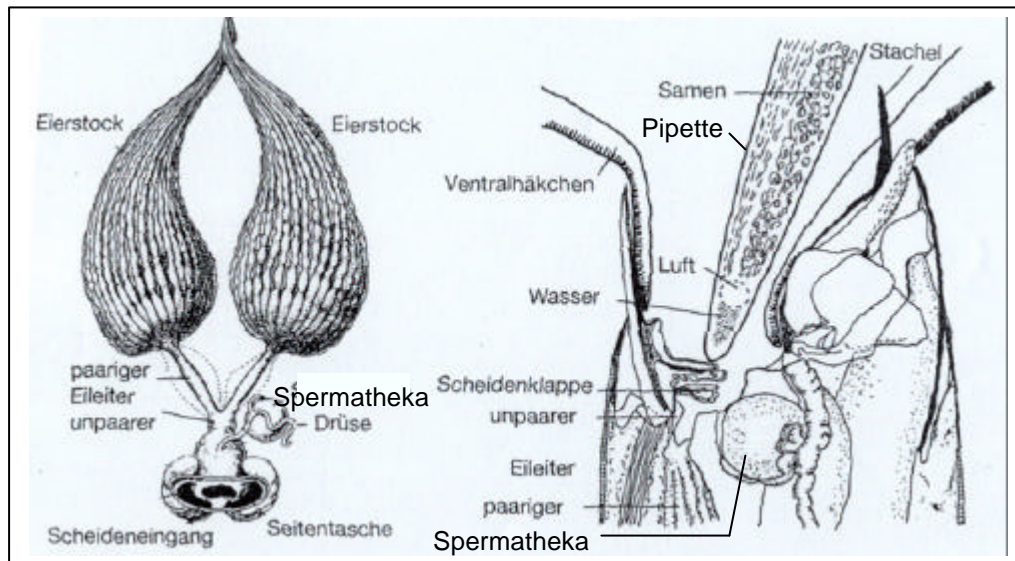
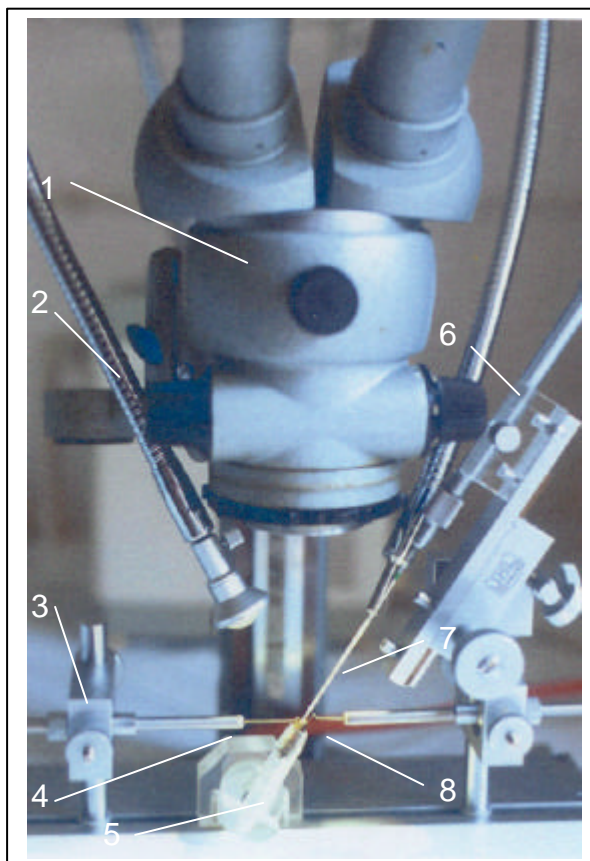


Abb. 7: Geschlechtsorgane und Stachelapparat der Königin
(mod. aus TIESLER, F.-K. und ENGLERT, E., 1989, S.127)

Ist die Königin korrekt aufgespannt, lässt sich die Glaskanüle mit dem Mischsperma problemlos in die Geschlechtsöffnung einführen (s. Abb. 7). Dann wird eine Portion von 10 µl Mischsperma in die Geschlechtsöffnung gegeben.



Legende zu Abb. 8:
1= Stereo-Mikroskop
2= Kaltlichtquelle
3= Stativ
4= Häkchen links
(Ventralhäkchen)
5= Königinnen-Halter mit
CO₂-Zufuhr
6= Besamungs-Spritze
7= Mikro-Kapillare mit
Misch-Sperma
8= Häkchen rechts
(Dorsalhäkchen mit
Loch für Stachel)

**Abb. 8: Geräteanordnung
bei der instrumentellen
Besamung**
(Foto mit freundlicher
Genehmigung aus dem
Fundus der HDLGN Kirch-
hain)

Die Besamung der Königin wird unter dem Mikroskop (Zeiss 392521) bei 10-40-facher Vergrößerung unter Beleuchtung durch eine Mikroskoplampe mit Kaltlichtfilter durchgeführt (s. Abb. 8).

Nach erfolgter Besamung wird der Königin ein Flügel zur Markierung und zur Minderung ihrer Flugaktivität gestutzt. Sie wird wieder in ihren Käfig verbracht, dessen Öffnung mit Futterteig verschlossen wird. Bei 35° C bleibt sie im Brutschrank, bis sie aus der Narkose erwacht. Als bald wird sie in ihr Völkchen zurückgegeben und von den Arbeiterinnen „freigefressen“ (s. auch Abb. 41 im Anhang).

3.6 Kontrolle der besamten Königinnen

3.6.1 Kontrolle der Eiablage



(aus WEILER, 2000, S. 38)

Diese Kontrollen dienen dem Nachweis der erfolgreichen instrumentellen Besamung der 74 Königinnen.

Die nach der instrumentellen Besamung wieder in ihre Völkchen verbrachten Königinnen wurden ab dem 6. Tag alle 2-3 Tage kontrolliert und der Eiablagebeginn ermittelt, indem der Entwicklungsstand der Larven bestimmt (s. Abb. 9) und auf das Eiablage-Datum zurückgerechnet wurde.

Abb. 9: Entwicklungszyklus der Bienenbrut am Beispiel der Arbeiterinnen

3.6.2 Kontrolle des Bruterfolges

Bei 30 der 74 instrumentell besamten Königinnen, die mit der Eiablage begonnen hatten, wurde eine leere Wabe in das Begattungskästchen (KBK) eingehängt. Die Königinnen wurden so ausgewählt, dass von jeder Versuchsgruppe mindestens 6 Königinnen vertreten waren.

Nachdem die Wabe bestiftet worden war, d.h. Eier auf ihr abgelegt worden waren, wurde der Brutbezirk auf einer aufgelegten stabilen Klarsicht-Folie vermerkt und der weitere Entwicklungsverlauf beobachtet (s. Abb. 10 und 11).

Unbefruchtete Eier, die sich zu Drohnen in Arbeiterinnenzellen entwickeln, werden daran erkannt, dass diese Zellen für die im Vergleich zu Arbeitsbienen größeren Drohnen zu klein sind und eine Verdeckelung mit einer konvexen Ausbuchtung aufweisen. Weiterhin wurden Inzucht-Effekte erfasst.

Ein solcher Inzucht-Effekt kann auftreten, wenn die Königin und der spermaspendende Drohn verwandt sind: auch bei einer „ X_iX_i “ oder „ X_kX_k -Konstellation“ (vgl. Kap. 2.1, S. 3) entwickelt sich dann ein Drohn; solche Drohnen werden aber i. d. R. von den Arbeiterinnen schon während des Larvenstadiums „entsorgt“, indem sie die so belegten Zellen ausfressen; es entstehen also Brutlücken.

Auch bei nichtverwandten Elterntieren kann es bei 4-6% der befruchteten Eier durch zufällig ähnliche Sex-Allele zu diesem Inzucht-Effekt kommen. Um diesen Effekt so gering wie möglich zu halten, wurden für diese Untersuchung die Königinnen der Rasse Buckfast und Drohnen der Rasse Carnica verwendet.

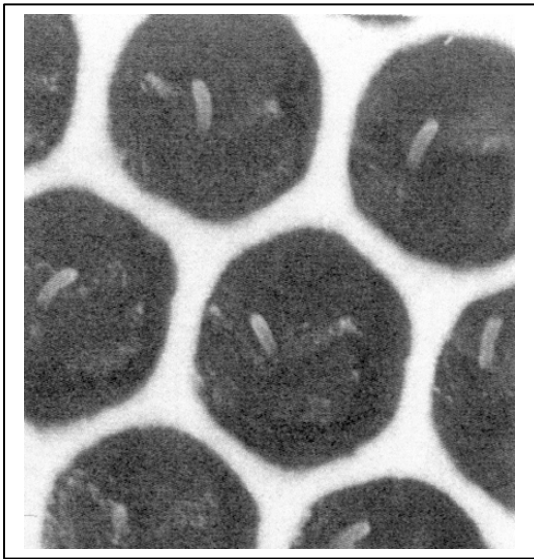


Abb. 10: Eier (Stifte) in Zellen
(aus WEILER, 2000, S. 30)

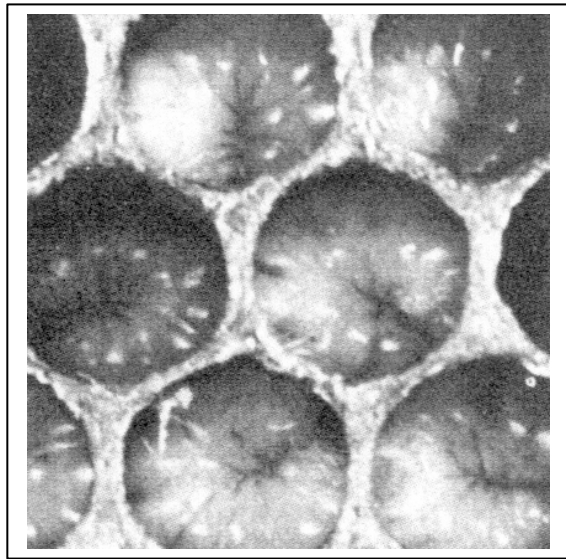


Abb. 11: Maden in Zellen
(aus WEILER, 2000, S. 32)

Die markierten Brutbereiche wurden erneut nach 3 Tagen und nach ca. 14 Tagen kontrolliert. Leergeräumte Zellen und Drohnenbrut wurden dabei auf der Folie vermerkt.

Bei Jungköniginnen kommt es zu Beginn ihrer Eilage immer wieder zu „Startschwierigkeiten“: einzelne Zellen werden mehrfach oder gar nicht bestiftet.

Um durch diesen Effekt auftretende Verfälschungen des Brutbildes zu vermeiden, wurde die Wabe zur Überprüfung des Besamungserfolges erst dann eingehängt, wenn die Königin schon etliche Zellen bestiftet hatte und diese Koordinationsprobleme ausgeschlossen werden konnten.

3.7 Präparation der Spermatheka

8-9 Wochen nach der Besamung wurden die 74 in Eilage gegangenen Königinnen chloroformiert, getötet und ihre Spermatheka unter einem Mikroskop bei 10-20facher Vergrößerung nach der im HDLGN Kirchhain üblichen Methode freipräpariert, um die dort eingelagerten Spermien zu gewinnen und ihre Lebensfähigkeit zu überprüfen. Die vom Tracheennetz befreite Spermatheka wurde in ein Uhrglas gelegt und mit einem Zellstofftuch trockengetupft.

500 µl des zur Besamung verwendeten Puffers wurde dazugegeben und die Spermatheka mit Präparierpinzetten auseinandergezupft. Das Uhrglas wurde für 3 Minuten auf eine 35 °C warme Heizplatte gestellt, damit sich die Spermien in der Pufferlösung ausbreiten konnten.

Das weitere Vorgehen ergibt sich aus dem in Abb. 9 dargelegten Schema. Abweichend von den für Frischsperma eingeführten Zielgrößen, wurde hier als zusätzlichen Parameter die Zahl der in der Spermatheka enthaltenen Spermien ermittelt.

3.7.1 Anzahl der Spermien in der Spermatheka

Nach Aliquotierung der Ausgangssuspension in 2 x 250 µl und Entnahme eines Tropfens (= 2 µl) zur Bestimmung der Motilität (wie in Kap. 3.8.1 beschrieben), wurden zu den 250 µl der im Uhrglas verbliebenen Suspension je nach Farbe der Spermatheka, die einen Hinweis auf den Füllungszustand der Spermatheka erlaubt, entweder 2000 µl (bei creme- oder elfenbeinfarbener Spermatheka) oder 1000 µl (bei weißer oder durchscheinender Spermatheka) Aqua dest. zugegeben und mit der Pipette vermischt.

Anschließend wurde die Bürker-Zählkammer zur Dichtebestimmung gefüllt (s. Untersuchungsschema Abb. 12).

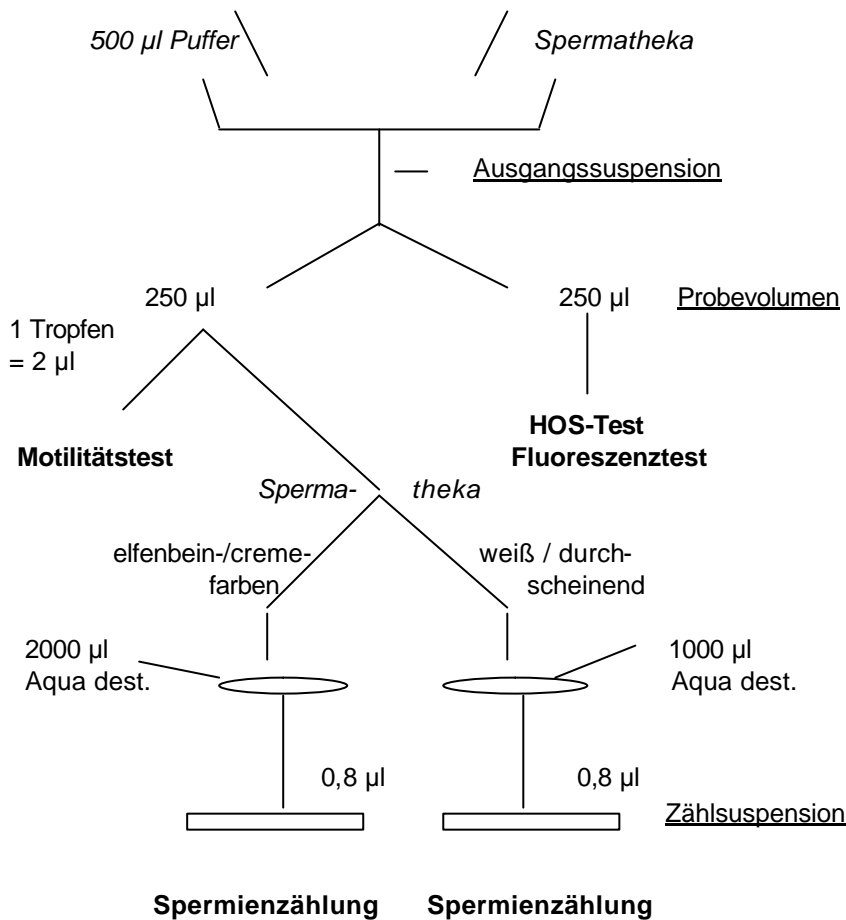


Abb. 12: Schema zur Untersuchung des Spermathekeninhalts

Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den Stegen der Zählkammer und dem verwendeten Deckplättchen Ohmsche Ringe 1. und 2. Ordnung gebildet hatten.

Danach wurde die Zählkammer 10 Min. vor dem Auszählen stehengelassen, damit sich die Spermien in einer Ebene ausrichten konnten. Unter dem Mikroskop (Olympus BX 40) wurden auf jedem der beiden Zählfelder bei 200 -facher Vergrößerung 4 mit Doppelstrichen markierte Einzelfelder (hier zur Verdeutlichung rot markiert) ausgezählt (s. Abb. 13).

Diese 8 Felder der Zählkammer hatten mit einer Länge von 1 mm, einer Breite von 1 mm und einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von $8 \times 0,1 \text{ mm}^3$. Dies entspricht einem Gesamtvolumen von 0,8 µl.

Die Konzentration der Spermien in der Stammlösung liegt 5-fach (Verdünnung 1:4) bei creme- oder elfenbeinfarbener Spermatheka bzw. 9-fach (Verdünnung 1:8) bei weißer oder durchscheinender Spermatheka über der Spermiedichte in der ausgezählten Suspension. Das Gesamtvolumen in der Ausgangssuspension betrug 500 µl.

Entsprechend ergibt sich die Gesamtspermienzahl, indem man die Zahl der ausgezählten Spermien in den 8 Feldern durch das Volumen dieser Felder teilt und mit dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen der Stammlösung multipliziert:

$$\frac{SZ \times \text{Vol. Ausgangssuspension (in } \mu\text{l}) \times VF}{\text{Vol. ausgezählte Felder (in } \mu\text{l})} = \text{Anzahl der Spermien in der Spermatheka / } \mu\text{l}$$

SZ = Anzahl der in den 8 Feldern ausgezählten Spermien

VF = Verdünnungsfaktor (5 bzw. 9)

Beispiel: Es wurden 202 Spermien in den 8 Feldern ausgezählt bei cremefarbenem Sperma (d.h. es wurde eine 9-fache Verdünnung gewählt).

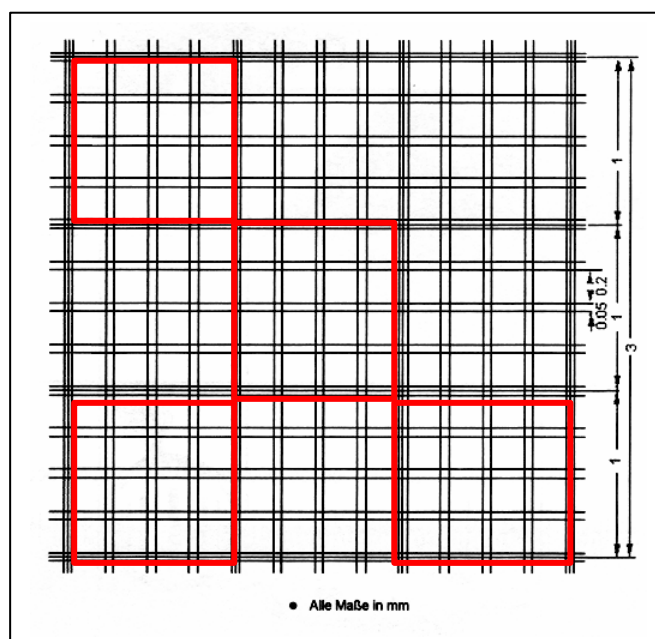


Abb. 13:
Schematische
Darstellung
eines der beiden
Zählfelder der
Bürker-Zählkammer

$$\frac{202 \times 500 \mu\text{l} \times 9}{0,8 \mu\text{l}} = 1\,136\,250, \text{ also ca. } 1,14 \text{ Mio. Spermien} \\ \text{in } 1 \mu\text{l Spermathekeninhalt}$$

(s. auch Abb. 42 „Spermien in der Bürker-Zählkammer“ im Anhang.)

Zusätzlich wurden die unter Kap. 3.7.1 und 3.8.2-3.8.3 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

3.8 Erfassung der anderen Zielgrößen

Diese Zielgrößen wurden sowohl an dem frisch gemischten Sperma vor der instrumentellen Besamung als auch an dem aus der Spermatheka entnommenen Sperma 8-9 Wochen später erfasst. Bei Frischsperma wurden dazu aus den zur Besamung bereitliegenden Kapillaren jeweils 10 μl entnommen und den Untersuchungen zugeführt.

Bei der Untersuchung des Frischspermas konnten aufgrund praktischer Gegebenheiten nur vom Mischsperma jeder Puffergruppe 3 Stichproben entnommen (insgesamt 12 Stichproben) und im Doppelansatz untersucht werden. Diese Ergebnispaarungen wurden jeweils gemittelt. Dieser geringe Stichprobenumfang zog eine unzureichende statistische Absicherung nach sich.

3.8.1 Anfangsaktivität und Motilität

Die Erfassung der Mobilität gliederte sich in zwei Stufen. Zur Darstellung der Anfangsaktivität wurde ein Tropfen des frisch gemischten oder der Spermatheka entnommenen Spermias auf einen auf 35 °C vorgewärmten Objektträger gegeben und mit einem Tropfen der jeweiligen auf 35 °C gewärmten Pufferlösung überschichtet.

Unter dem Mikroskop (Fa. Leitz, Wild M 20) wurde dann bei 100 -facher Vergrößerung an 5 Stellen des Spermatropfens das Ausbreiten der Spermien in die Pufferlösung (Grenzbereich Mischsperma/Puffer) und die Bewegungsaktivität mit 0 bis 4 Punkten bewertet.

Die Bewertung erfolgte anhand eines von KRAUSE (1966) entwickelten und von FISCHER (1989) modifizierten Schemas:

Tab. 2: Bewertungsschema für die Anfangsaktivität von Bienensperma

0	keine Bewegungsaktivität, keinerlei Bewegung feststellbar
1	kaum Bewegungsaktivität, nur Bewegung einzelner Spermien am Ort, keine Ausbreitung in die Verdünnerlösung
2	geringgradige bis mäßige Bewegungsaktivität, schwache Bewegung der Spermien, Ausbreitung weniger Spermien in die Verdünnerlösung
3	gute Bewegungsaktivität, lebhafte Bewegung der Spermien, Ausbreitung der Spermien in die Verdünnerlösung
4	sehr gute Bewegungsaktivität, starke Bewegung der Spermien, Ausbreitung der Spermien in die Verdünnerlösung, dabei Bildung von parallel liegenden Verdichtungen und Kreisen

Anschließend wurden Mischsperma- und Puffertropfen gemischt und nach 2 Minuten erneut die Motilität ermittelt. Das Bewertungsschema gestaltete sich hier wie folgt:

Tab. 3: Bewertungsschema für die Motilität von Bienensperma zwei Min. nach der ersten Bewertung

0	keine Bewegungsaktivität, keinerlei Bewegung feststellbar
1	kaum Bewegungsaktivität, nur Bewegung einzelner Spermien am Ort
2	geringgradige bis mäßige Bewegungsaktivität, schwache Bewegung der Spermien
3	gute Bewegungsaktivität, lebhafte Bewegung der Spermien, flache Wellen
4	sehr gute Bewegungsaktivität, starke Bewegung der Spermien, dabei Bildung von parallel liegenden Verdichtungen und Kreisen

Die Spermienbewegung wurde an 5 verschiedenen Stellen des Spermatropfens mit 0 bis 4 Pkt. bewertet.

Von diesen jeweils 5 Werten wurde der arithmetische Mittelwert ermittelt.

3.8.2 Identifizierung toter Spermien mittels Fluoreszenzfärbung

3.8.2.1 Untersuchungen des Frischspermas

Zu dieser Untersuchung wurden 5 µl des frisch gemischten Spermas mit 100 µl auf 40°C vorgewärmten PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, pH 7,2) gemischt. Danach wurden 10 µl des dunkel und kühl gelagerten, 1:100 verdünnten Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid (HOECHST 33258; Stammlösung: 5 µg Farbstoff in 100 µl PBS) vorsichtig dazugegeben und die Probe 10 Min. im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert.

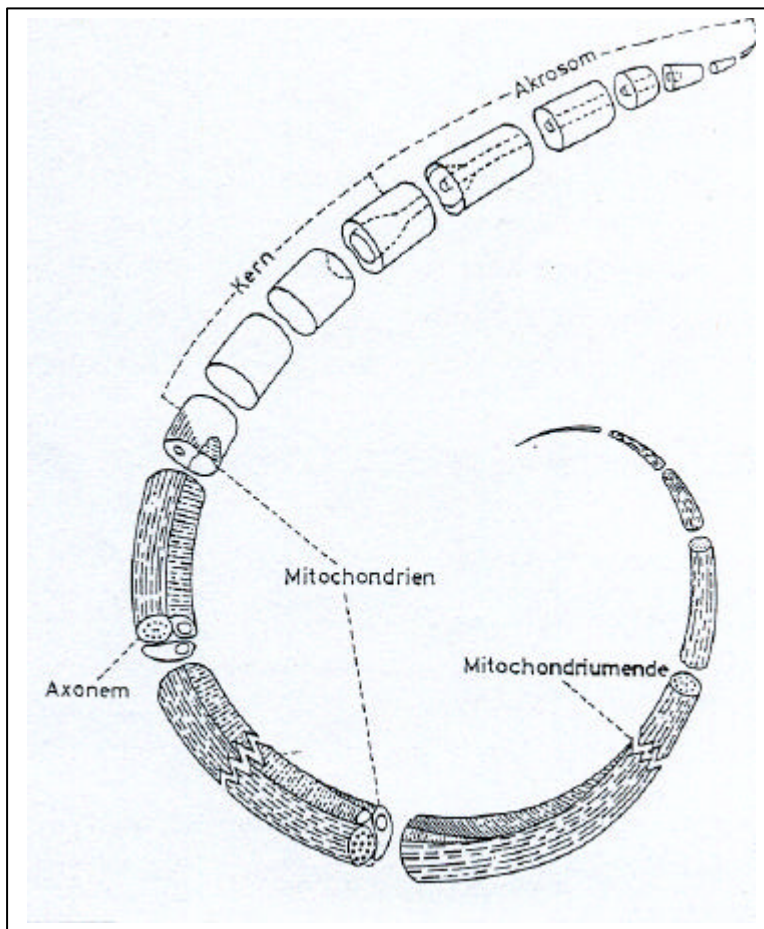


Abb. 14:
Schematische
Darstellung eines
Bienenpermiums,
(nach OEHM 1991,
S. 10)

Danach wurde ein Ausstrich hergestellt, der bei Raumtemperatur im Dunklen trocknete und anschließend mit erwärmter Glycerolgelatine zur Fluoreszenzmikroskopie überschichtet wurde. Die Auswertung der Ausstriche erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop ORTHOPLAN der Fa. Leitz, Germany bei einer Anregung von 340-380 nm (ultraviolett) mit einem Reflexions-Kurzpassfilter von 400 nm und einem Sperrfilter (Langpassfilter) von 425 nm, indem 100 Spermien begutachtet wurden.

Der Farbstoff bindet an das Chromatinmaterial des Kerns (s. Abb. 14, s. auch Abb. 1 und 2, Kap. 2).

Bei lebenden Spermien wird der Farbstoff vermutlich durch aktiven Transport wieder aus dem Spermium ausgeschleust; das bedeutet, dass sich die Kern-Bereiche lebender Spermien nur schwach färben, die Kern-Bereiche toter Spermien fluoreszieren hingegen stark blau (s. Abb. 15, 16 und 17).

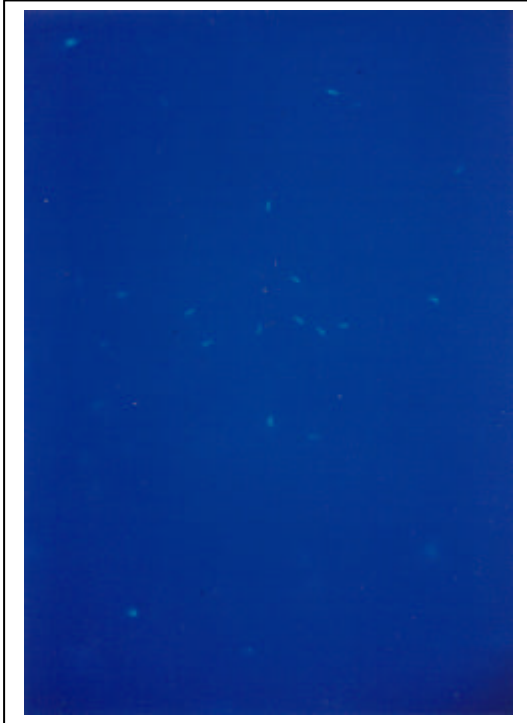


Abb. 15: Lebende Spermien fluoreszieren nur schwach (250-fache Vergrößerung)

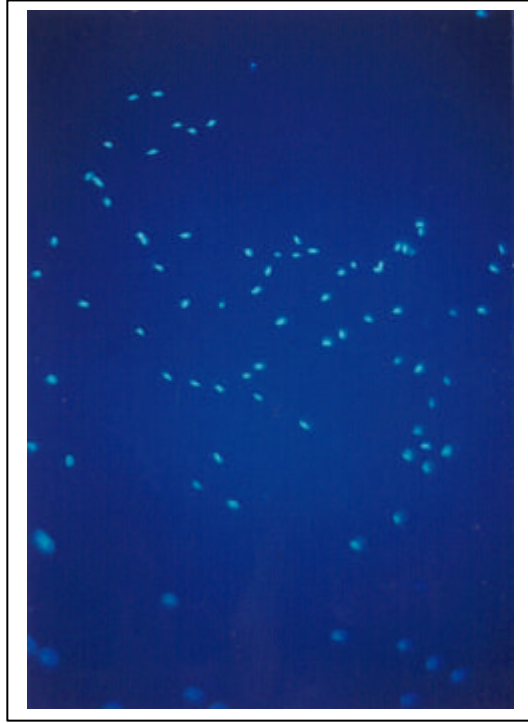


Abb. 16: Tote Spermien fluoreszieren hell (250-fache Vergrößerung)



Abb. 17: Lebende und tote Spermien bei der Fluoreszenz-Mikroskopie (400-fache Vergr.)

3.8.2.2 Untersuchungen des Spermathekeninhalts

40 µl der Spermatheka-Suspension (s. Abb. 11) wurden mit 10 µl PBS und 5 µl 1:100 verdünntem Hoechst-Farbstoff (Bisbenzimid; HOECHST 33258) gemischt; die weitere Behandlung erfolgte wie in Kap. 3.8.2.1 angegeben.

3.8.3 Hypoosmotischer Schwelltest

Diesem liegen die in Kap. 2.5, S. 13 dargelegten Kriterien zugrunde. Messparameter ist der Osmotische Resistenzwert (ORW).

Erfasst werden die Veränderungen der Spermien, die dem Verbringen in ein hypotones Medium zugeschrieben werden. Diese können bei Bienensperma in einem Aufrollen des vorderen Schwanzes [Bereich hinter der Akrosom- und Kern- (Nucleus-) Zone], des mittleren Schwanzes oder des hinteren Schwanzes gesehen werden.

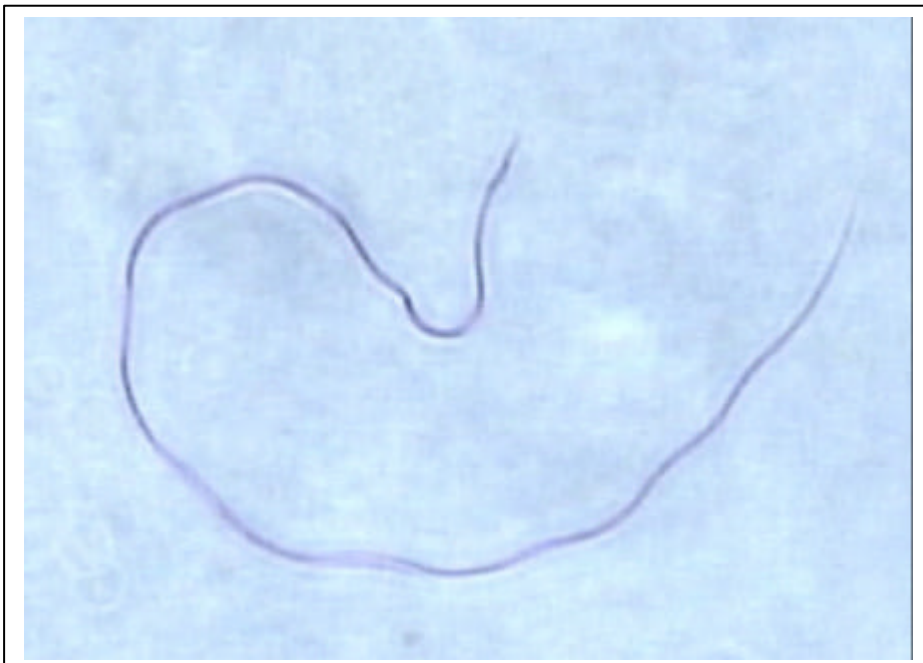


Abb.18 : HOS: unverändertes Spermium

Es wurden jeweils 100 Spermien beurteilt, wobei die folgenden Veränderungen erfasst wurden:

- unverändertes Spermium
- aufgerollter vorderer Schwanz-Bereich
- aufgerollter mittlerer Schwanz-Bereich
- aufgerollter hinterer Schwanz-Bereich

(s. Abb. 19–21)

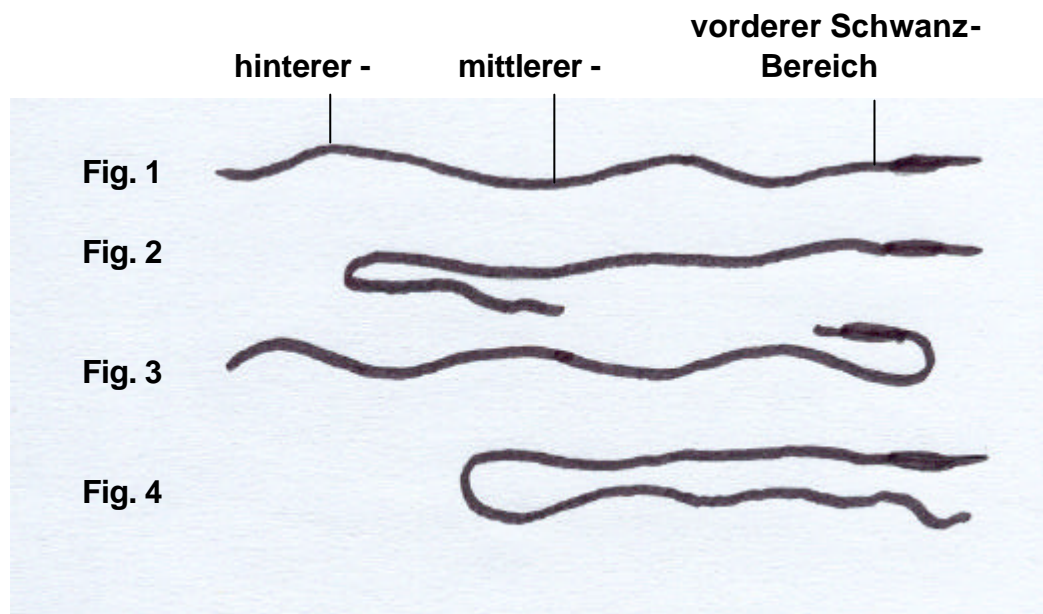


Abb. 19: Schematische Darstellung der erfassten Veränderungen

Erläuterungen zu Abb. 19: Kern- bzw. Nucleuszone übertrieben dargestellt

Fig. 1: unverändertes Spermium

Fig. 2: aufgerollter hinterer Schwanz-Bereich

Fig. 3: aufgerollter vorderer Schwanz-Bereich

Fig. 4: aufgerollter mittlerer Schwanz-Bereich

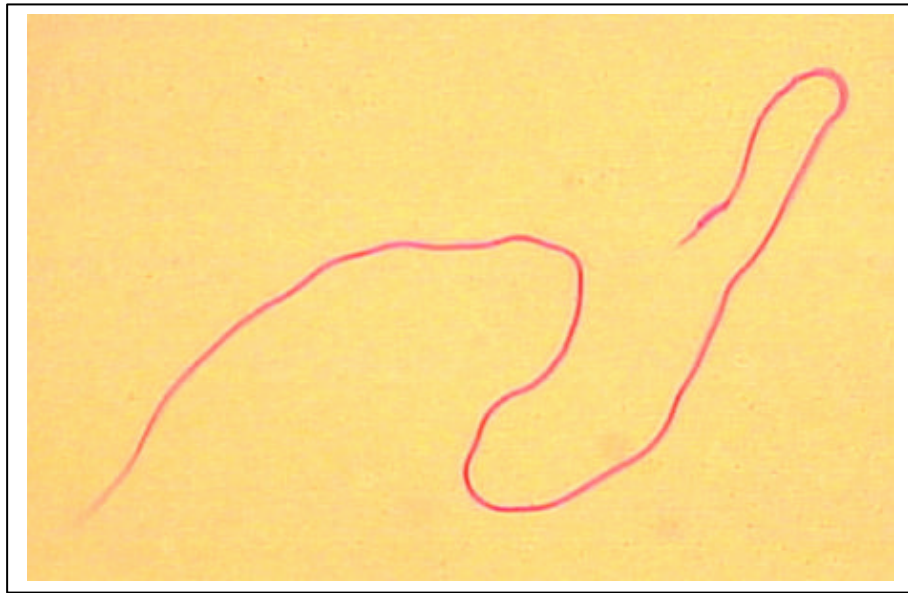


Abb. 20: HOS: Spermium mit aufgerolltem vorderen Schwanz-Bereich

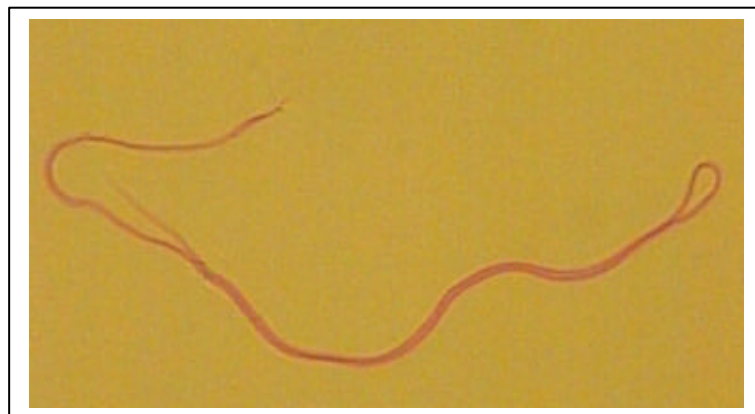


Abb. 21: HOS: Gerollter mittlerer Schwanz-Bereich

Es wird der arithmetische Mittelwert der Summe der veränderten Spermien im isotonen Medium (VSI) und der veränderten Spermien im hypotonen Medium (VSH) berechnet und daraus der ORW nach der folgenden Formel (LEIDINGER-KREILAUS, 1998) bestimmt:

$$\text{ORW} = 100 - \frac{1}{2} (\% \text{VSI} + \% \text{VSH})$$

Unabhängig davon wurden folgende Beobachtungen dokumentiert

(s. Abb. 22-24):

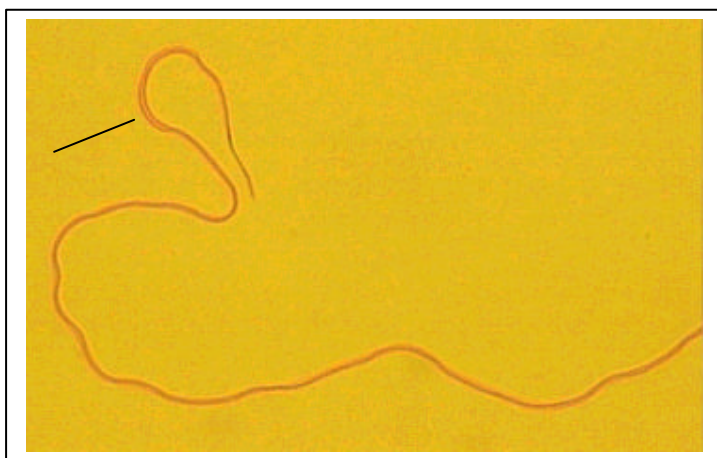
- gefaserter vorderer Schwanz-Bereich
- gefaserter mittlerer Schwanz-Bereich



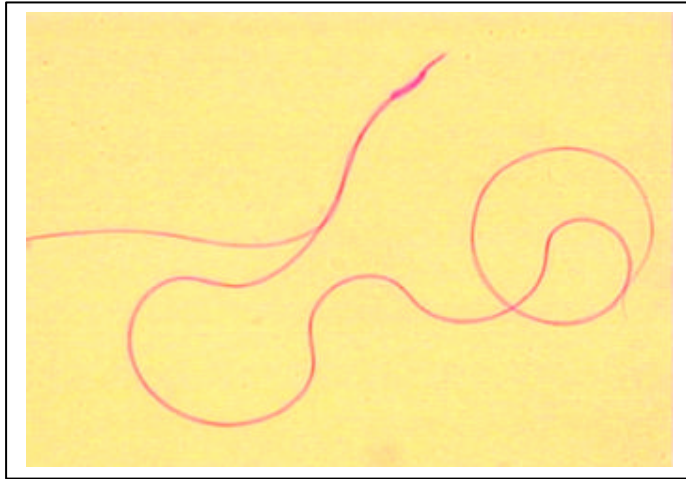
Abb. 22: Schematische Darstellung der zusätzlich dokumentierten Veränderungen

Erläuterungen zu Abb. 22: Fig. 5: Gefaserter vorderer Schwanz-Bereich

Fig. 6: Gefaserter mittlerer Schwanz-Bereich



**Abb. 23: HOS:
Gefaserter vorderer
Schwanz-Bereich (Pfeil)**



**Abb. 24: HOS:
Gefasertes mittlerer
Schwanz-Bereich**

3.8.3.1 Untersuchungen des Frischspermas

Zur Durchführung dieses Testes wurden in einem Eppendorf-Gefäß 3 µl des Mischspermas mit 100 µl physiologischer Salzlösung nach Hyes durch Kippen vermischt [Die physiologische Salzlösung nach Hyes weist mit einer Osmolarität von ungefähr 463 mosmol/ml (bei einem pH von 8,5) eine ähnliche Osmolarität auf wie das Bienensperma (pH 6,2) mit 467 mosmol/ml (pers. Mitteilung FREUDIGER; VERMA, 1973)]. Das hypoosmolare Medium ergab sich nach Zugabe von 100 µl Aqua dest..

Nach 2-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur in dieser Lösung wurden 20 µl auf einen Objektträger gegeben und 10 µl Formolcitrat-Bengalrosa-Lösung zur Färbung und Fixierung der Spermien dazugegeben, wonach die Probe vorsichtig vermischt und mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde. Die Beurteilung erfolgte anschließend bei 400-facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop.

Für die Referenzwerte wurden 3 µl des Mischspermas in 200 µl Hyes-Lösung (isotones Medium) gegeben und durch Kippen vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Spermien suspension wie oben beschrieben behandelt und die Spermien beurteilt.

3.8.3.2 Untersuchungen des Spermathekeninhalts

20 µl des verdünnten Spermathekeninhalts wurden zu 40 µl Hyes- Lösung (Osmolarität s. Kap. 3.8.3.1) gegeben. Für das hypotone Medium wurden 10 µl Hyes-Lösung und 30 µl Aqua dest. gemischt und 20 µl des Spermathekeninhalts hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben wie in Kap. 3.8.3.1 beschrieben behandelt.

3.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Release 7.0, (DIXON, 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT, Version 2.0, (EISENSMITH, 1993) bzw. PlotIT für Windows, Version 3.20h, (EISENSMITH, 1994) erzeugt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichung (SD), und Stichprobenumfänge (n) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt und die Daten mithilfe von geometrischen Mittelwerten (\bar{x}_g) und Streufaktoren (SF), dargestellt in Form von Intervallen $[\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}]$, vorgenommen.

Zur statistischen Prüfung des Gruppen-Einflusses auf Signifikanz wurde bei den angenähert normalverteilten Merkmalen eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgeraden ($y = mx+b$).

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.10 Reagenzien und Materialien

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Tris-Puffer

Tab. 4: Tris-Puffer

Substanz	Menge (g)
Tris-HCl	0,0221
Tris-Base	0,0436
NaCl	1,1
Glucose x H ₂ O	0,11
L-Arginin-HCl	0,01
L-Lysin	0,01

Aqua dest. ad 100 ml

pH 8,7

Steril filtriert; täglich pH-Kontrolle, bei Bedarf mit NaOH oder HCl auf pH einstellen.

Sorensen-Phosphat-Puffer**Tab. 5: Sorensen-Phosphat-Puffer**

Substanz	Menge (g)
KH_2PO_4	0,0259
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,08495
NaCl	1,1
Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$	0,11
L-Arginin-HCl	0,01
L-Lysin	0,01

Aqua dest. ad 100 ml

pH 7,2

Steril filtriert; täglich pH-Kontrolle, bei Bedarf mit NaOH oder HCl auf pH einstellen.

Physiologische Salzlösung nach Hyes**Tab. 6: Physiologische Salzlösung nach Hyes**

Substanz	Menge (g)
NaCl	0,9
KCl	0,02
CaCl	0,02
NaHCO_3	0,01

Aqua dest. ad 100 ml

pH 8,5

PBS (Puffersalze nach Dulbecco)**Tab. 7a und 7 b: PBS (Puffersalze nach Dulbecco)**

Substanz 1	Menge (g)
NaCl	0,8
KCl	0,02
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,01
CaCl ₂	0,01

In 45 ml Aqua dest. lösen

Substanz 2	Menge (g)
Na ₂ HPO ₄	0,1
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,015
KH ₂ PO ₄	0,02

In 45 ml Aqua dest. lösen, mit Substanz 1 zusammen gießen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen.

Formolcitrat-Bengalrosa-Lösung**Tab. 8: Formolcitrat-Bengalrosa-Lösung**

Substanz	Menge
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	2,9 g
Aqua bidest.	ad 100 ml
Formoldehydr.-Lsg. 35%	4,0 ml
Bengalrosa	0,156 g

Materialien:**Benötigte Utensilien für die Fluoreszenzmikroskopie**

Reagenzglas

PBS

Farblösung HOECHST 33258 (Bisbenzimid)

Eppendorf-Hütchen

Objektträger und Deckgläser (24 x 40 mm)

Kaiser's Glycerol-Gelatine

Wasserkocher

Dunkler Kasten für Objektträger und Farbstoffe

Latex-Handschuhe

Glasstab und Präpariernadel

Benötigte Utensilien für die Präparation der Spermatheka und die Untersuchung des Spermatheka-Inhalts

Mit Wachs ausgegossene Präparierschale

Präpariernadeln, -Schere und -Pinzetten

Uhrgläser

Puffer (Tris- und Phosphat-)

Aqua dest.

Objektträger

Pipetten

Bürker-Zählkammer

Benötigte Utensilien für den Hypoosmotischen Schwelltest

Eppendorf-Hütchen

Reagenzgläser für Hyes-Lösung, Formolcitrat und Aqua dest.

Hyes-Lösung (pH 8,5)

Objektträger

Zur Fixierung und Färbung: Formolcitrat-Bengalrosa-Lösung

Deckgläser (24 x 40 mm)

4 Ergebnisse

4.1 Anfangsaktivität

4.1.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts

Die Untersuchungen erfolgten an 74 Proben der in Eiablage gegangenen Königinnen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 9 und Abb. 25 wiedergegeben.

Tab. 9: Anfangsaktivität (0-4 Pkt.) der Spermien nach Gewinnung aus der Spermatheka (\bar{x}_g -SF)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g		0,818	1,294	0,537	0,675
SF		1,905	1,862	1,377	1,807
Anzahl Königinnen n		24	17	20	13
Einfl.Fa.	Pufferver.	p = 0,001			
	Eidottzus.	p = 0,0119			
	Interakt.	n.s.			

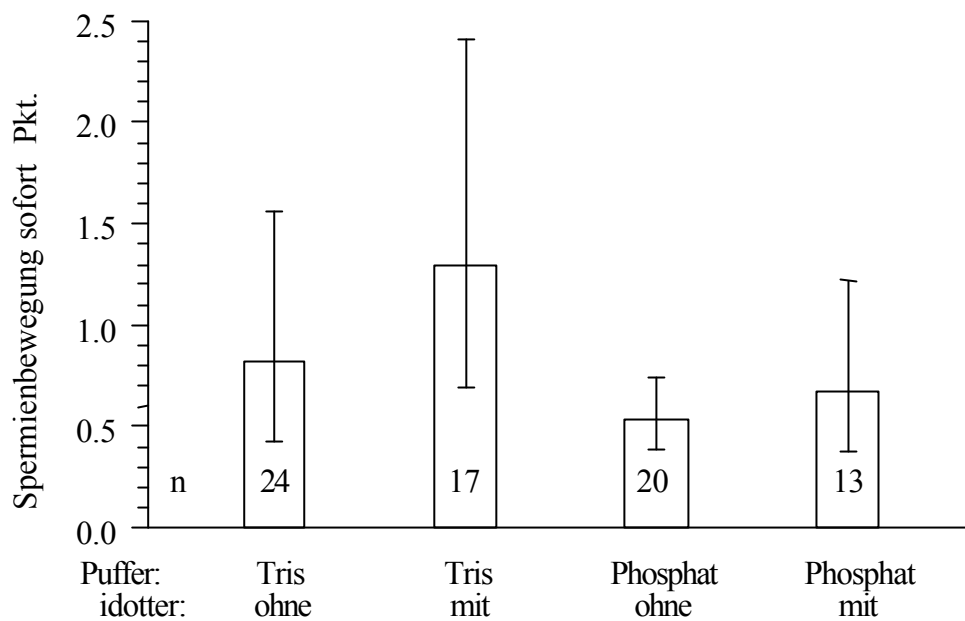


Abb. 25 : Anfangsaktivität der Spermien nach Gewinnung aus der Spermatheka ($\bar{x}_g \cdot SF \pm 1$) [in Pkt.(0-4)]

Der Einfluss des Puffers ist mit $p = 0,001$ hoch signifikant, der der Eidotterzugabe mit $p = 0,0119$ ebenfalls statistisch abgesichert.

Mit Tris-Puffer aufbereitete Spermien zeigten eine höhere Anfangsaktivität, wobei der Zusatz von Eidotter einen verstärkenden Effekt auf beide Verdünnerlösungen hatte.

4.1.2 Untersuchung des Frischspermas

Wie in Kap. 3.8 dargelegt, gestattete der Versuchsablauf lediglich die Untersuchung von 3 Stichproben pro Puffer.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst:

**Tab. 10: Anfangsaktivität der Spermien des frisch gemischten Spermas sofort nach Überschichtung mit Pufferlösung;
Die Ergebnisskala reicht von 0-4 (\bar{x} /SD).**

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
Probe 1	1,6	1,8	1,4	1,8
Probe 2	1,4	1,0	0,8	1,4
Probe 3	1,4	1,2	0,6	1
\bar{x}	1,467	1,333	0,933	1,400
SD	0,115	0,416	0,416	0,400
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht. Bei einer Reihung der Mittelwerte liegt der für Phosphatpuffer ohne Eidotter ermittelte Wert mit deutlichem Abstand am unteren Ende.

4.2 Motilität

Die Erfassung der Motilität erfolgte 2 Minuten nach Überschichtung mit der Pufferlösung (s. Kap. 3.8.1, S. 30).

4.2.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts

Die Untersuchung erfolgte an den unter 4.1.1 genannten 74 Spermaproben; die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengefasst. Daraus sowie aus der Gegenüberstellung in Abb. 26 ergibt sich, dass im Vergleich zur Anfangsaktivität die Motilität bei allen Puffern nach 2 Minuten abgesunken war ($p < 0,01$).

Tab. 11: Motilität der Spermien (0-4 Pkt.) des Spermathekeninhalts zwei Minuten

nach Überschichtung mit Pufferlösung (\bar{x}_g . SF)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g		0,643	0,916	0,395	0,430
SF		1,914	2,307	1,500	1,964
Anzahl Königinnen n		24	17	20	13
EinflFa.	Pufferver.	p = 0,0001			
	Eidotterzus.	n.s.			
	Interakt.	n.s.			

Der Einfluss des Puffers ist mit $p = 0,0001$ statistisch hoch abgesichert, wobei sich für den Trispuffer deutlich höhere Werte als für den Phosphatpuffer ergaben. Der Eidottereinfluss liegt bei $p = 0,1597$ und ist damit nicht signifikant.

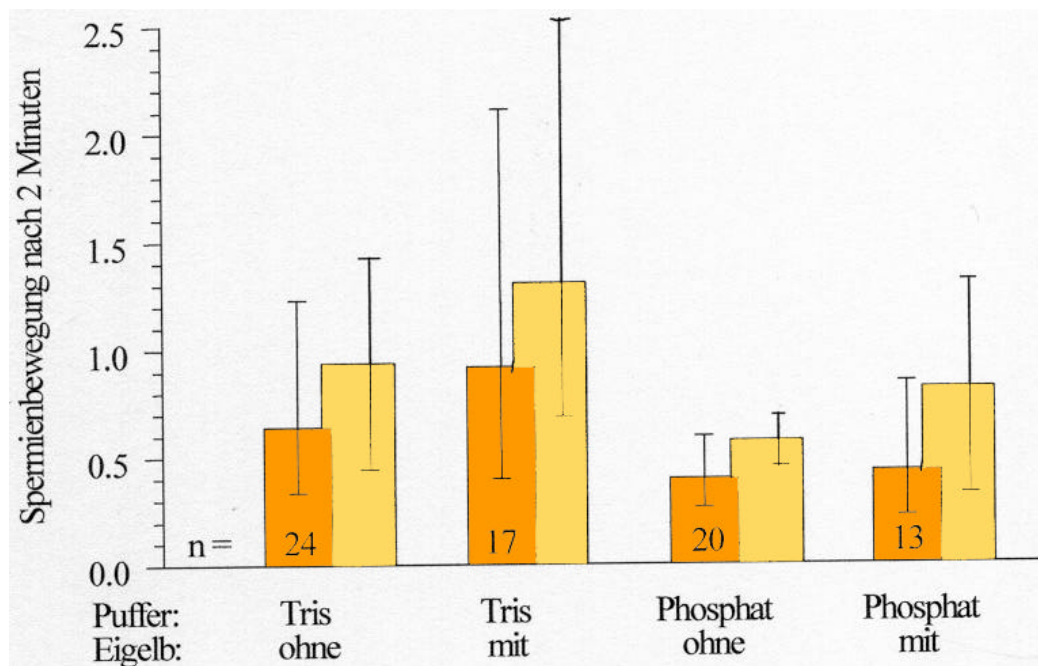


Abb. 26 : Motilität ■ und Anfangsaktivität ■ der Spermien (Punkteschema von 0-4, s. Kap. 3.8.1) aus dem Spermathekeninhalt nach Überschichtung mit Pufferlösung ($\bar{x}_g.SF \pm 1$)

4.2.2 Untersuchung des Frischspermas

Die Bewertung erfolgte an den unter 4.1.2 genannten 12 Spermaproben.

Tabelle 12: Motilität der Spermien des Frischspermas zwei Minuten nach Überschichtung mit Pufferlösung (\bar{x} / SD)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
Probe 1	0,8	0,8	0,4	0,8
Probe 2	0,6	0,6	0,2	0,8
Probe 3	0,4	0,2	0,2	0,6
\bar{x}	0,600	0,533	0,267	0,733
SD	0,200	0,306	0,115	0,115
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Wie Tabelle 12 zeigt, lagen auch hier die Durchschnittswerte der Phosphatpuffer-Gruppe ohne Eidotter am Ende der Rangfolge. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht.

4.3 Erfassung der toten Spermien mittels Fluoreszenzfärbung

4.3.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts

Die Untersuchung wurde an den unter 4.1.1 genannten 74 Spermaproben durchgeführt. Tabelle 13 gibt den Anteil schwach fluoreszierender Spermien (= lebender Spermien) an, Abbildung 27 verdeutlicht die Untersuchungsergebnisse:

Tab. 13: Anteil schwach fluoreszierender (lebender) Spermatheka-Spermien in % (\bar{x} .SD)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}		33,066	44,830	47,609	49,974
SD		22,434	16,859	22,372	21,347
Anzahl Königinnen n		24	17	20	13
EinfIa.	Pufferver.	p = 0,0542			
	Eidottzus.	n.s.			
	Interakt.	n.s.			

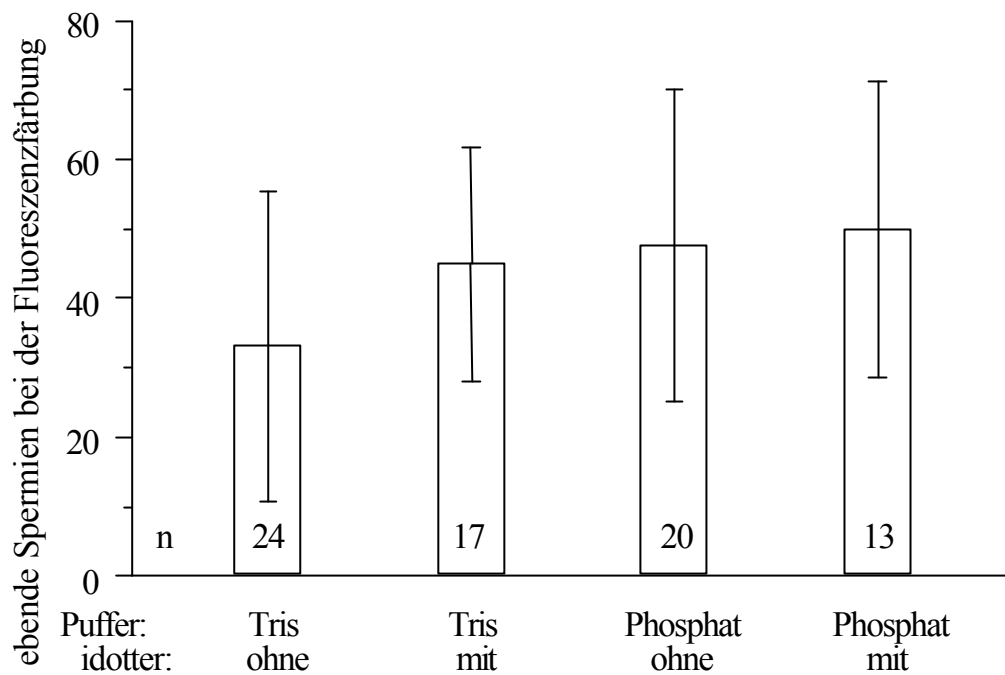


Abb. 27: Anzahl schwach fluoreszierender (lebender) Spermatheka-Spermien ($\bar{x} \pm SD$)

Der Trispuffer ohne Eidotter-Zusatz wies die geringste Zahl schwach fluoreszierender Spermien und damit die höchste Zahl an toten Spermien auf. Insgesamt liegt der Anteil schwach fluoreszierender bzw. lebender Spermien zwischen 33 und 50%.

Der Einfluss des Puffers liegt mit $p = 0,0542$ knapp unter der Signifikanzgrenze.

4.3.2 Untersuchung des Frischspermas

Die Fluoreszenzuntersuchung erfolgte an den unter 4.1.2 genannten 12 Spermaproben. Wie Tab. 14 zeigt, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 14: Anteil schwach fluoreszierender Spermien im Frischsperma in %
(\bar{x} ;SD)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	54,503	49,31	50,75	53,107
SD	23,03	5,458	10,168	6,667
Anzahl Proben n	3	3	3	3
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

4.4 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS)

Die Auswertung der mit dem HOS-Test erhaltenen Werte erfolgte deskriptiv.

Die Bewertung des Spermathekeninhalts erfolgte an den in Kap. 4.4.2 genannten 74 Spermaproben, die Begutachtung des frisch gemischten Spermas erfolgte an den in Kap. 4.1.1 beschriebenen 12 Spermaproben. Wie angegeben (s. Kap. 3.8.3.1 und 3.8.3.2), erfolgte die Bewertung nach 2 Stunden Inkubationszeit in der hypoosmolaren Lösung; der Kontrollwert ergab sich nach 15-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur (25 °C) in iso-osmolarer Lösung.

Ausgezählt wurden je 100 Spermien und dabei die Veränderungen notiert.

4.4.1 Gerollter hinterer Schwanz-Bereich (HSB)

4.4.1.1 Untersuchungen des Spermathekeninhalts: Gerollter HSB

Die Untersuchung erfolgte an den in Kap. 4.1.1 genannten 74 Spermaproben.

Tabelle 15 und Abbildung 28 fassen die Untersuchungsergebnisse zusammen.

Tab. 15: Spermathekeninhalt: HOS; Anteil der Spermien mit dem Merkmal „gerollter HSB“ in % (\bar{x}_g .SF)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g	6,839	8,035	9,594	9,863
SF	2,223	1,698	2,009	1,730
Anzahl Königinnen n	24	17	20	13
EinfFa.	Pufferver.	n.s.		
	Eidotterzus.	n.s.		
	Interakt.	n.s.		

Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht, es ergaben sich jedoch Hinweise auf eine Häufung des Merkmals bei den mit Phosphatpuffer verdünnten Spermien. Auf einen Einfluss des Eidotterzusatzes kann nicht geschlossen werden.

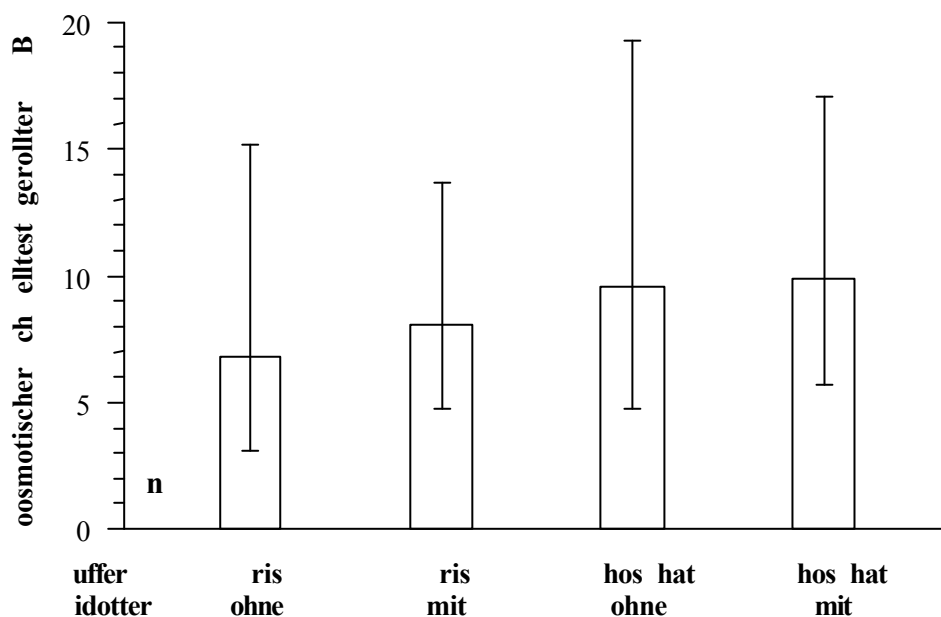


Abb. 28: Spermathekeninhalt: HOS; Anzahl der Spermien mit dem Merkmal „gerollter HSB“ (\bar{x}_g .SF ± 1)

4.4.1.2 Untersuchung des Frischspermas: Gerollter HSB

Die Begutachtung des frisch gemischten Spermas erfolgte an den unter Kap. 4.1.1 genannten 12 Spermaproben.

Tab. 16: Frisch gemischtes Sperma: HOS; Anteil der Spermien mit dem Merkmal „gerollter HSB“ in % (\bar{x} ;SD).

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	8,25	6,50	9,00	6,33
SD	3,31	2,29	1,09	1,23
Anzahl Proben n	3	3	3	3
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Signifikante Effekte ergaben sich nicht, die Zahl der Spermien mit einem aufgerollten hinteren Schwanz-Bereich liegt der Tendenz nach bei dem Puffer ohne Eidotter jedoch höher als bei dem Puffer mit Eidotterzusatz.

4.4.2 Gerollter vorderer Schwanz-Bereich (VSB)

4.4.2.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts: Gerollter VSB

Die Untersuchung erfolgte an den in Kap. 4.1.1 genannten 74 Spermaproben. Tabelle 17 und Abbildung 29 fassen die Untersuchungsergebnisse zusammen.

Tab. 17: Spermathekeninhalt: HOS; Anteil der Spermien mit dem Merkmal „gerollter VSB“ in % (\bar{x}_g ;SF)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g	3,899	7,015	3,981	4,667
SF	2,415	1,374	1,710	2,018
Anzahl Königinnen n	24	17	20	13
EinflFa.	Pufferver.	n.s.		
	Eidotztus.	p = 0,0201		
	Interakt.	n.s.		

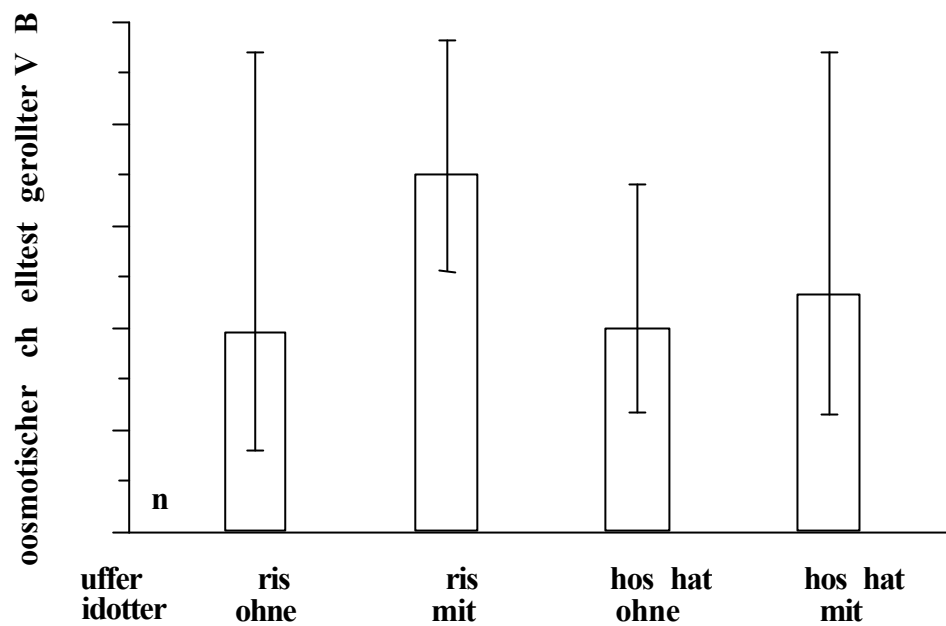


Abb. 29 : Spermathekeninhalt: HOS; Anzahl der Spermien mit dem Merkmal „gerollter VSB“ ($\bar{x}_g \pm SF$)

Bei Verdünnung der Spermien mit Puffern mit Eidotterzusatz ergaben sich höhere Werte als bei der Verwendung von Puffern ohne Eidotterzusatz ($p < 0,05$). Weitere Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

4.4.2.2 Untersuchung des Frischspermas: Gerollter vorderer Schwanz-Bereich (VSB)

Tab. 18: Frisch gemischtes Sperma: HOS; Anteil der Spermien mit dem Merkmal „gerollter VSB“ in % (\bar{x} ; SD)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	3,75	4,167	4,00	2,08
SD	1,00	1,01	0,66	0,80
Anzahl Proben n	3	3	3	3
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die Begutachtung des frisch gemischten Spermas erfolgte an den unter Kap. 4.1.1 genannten 12 Spermaproben.

Der Effekt von Puffer- und Eidotterzusatz war mit $p = 0,051$ knapp nicht mehr signifikant. Die gegenläufigen Befunde nach Eidotterzusatz zum Tris- und Phosphatpuffer gestatten jedoch keine sinnvolle Schlussfolgerung.

4.4.3 Gerollter mittlerer Schwanz-Bereich (MSB)

4.4.3.1 Untersuchungen des Spermathekeninhalts: Gerollter mittlerer Schwanz-Bereich (MSB)

Die Untersuchung erfolgte an den in Kap. 4.1.1 genannten 74 Spermaproben. Tabelle 19 und Abbildung 30 zeigen die erhaltenen Ergebnisse. Ein Einfluss von Puffer und Eidotterzusatz ist nicht zu erkennen. Über alle Gruppen ergab sich ein mittlerer Anteil von $1,77 \pm 2,42\%$. Das Merkmal „gerollter MSB“ ist in allen Puffergruppen nahezu gleich stark ausgeprägt.

Tab. 19: Spermathekeninhalt: HOS; Anteil der Spermien mit dem Merkmal „gerollter MSB“ in % (\bar{x}_g / SF)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
	\bar{x}_g	1,758	1,820	1,782	1,722
	SF	2,594	2,393	2,600	2,109
	Anzahl Königinnen n	24	17	20	13
EinflFa.	Pufferver.	n.s.			
	Eidottzus.	n.s.			
	Interaktion	n.s.			

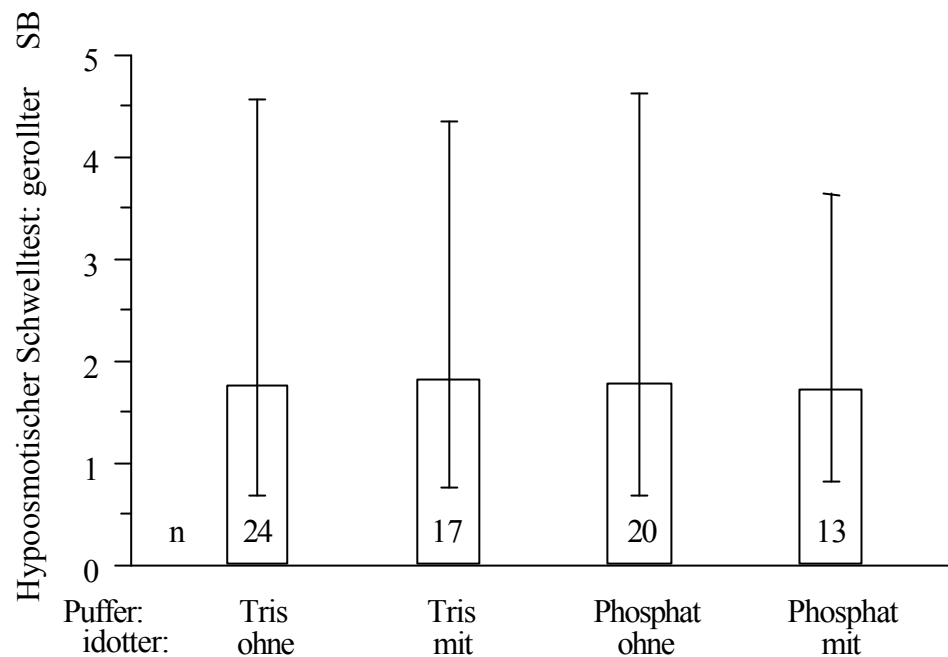


Abb. 30: Spermathekeninhalt: HOS; Anzahl der Spermien mit dem Merkmal „gerollter MSB“ ($\bar{x}_g \cdot SF \pm 1$)

4.4.3.2 Untersuchungen des Frischspermas: Gerollter mittlerer Schwanz-Bereich (MSB)

Die Begutachtung des frisch gemischten Spermas erfolgte an den unter Kap. 4.1.1 genannten 12 Spermaproben. Wie Tab. 20 zeigt, konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Der Anteil an Spermien mit dem Merkmal „gerollter MSB“ lag bei $6,71 \pm 3,73\%$.

Tab. 20: Frisch gemischtes Sperma: HOS; Anzahl der Spermien mit dem Merkmal „gerollter MSB“ (\bar{x} ; SD)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	8,08	6,08	5,25	7,42
SD	2,77	4,04	3,38	4,73
Anzahl Proben n	3	3	3	3
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

4.4.4 ORW (osmotischer Resistenzwert)

Zur Berechnung des ORW (s. Kap. 3.8.3, S. 37 ff.) wurden die jeweiligen im HSB, VSB und MSB erfassten Veränderungen bei der Versuchs- und Kontrollgruppe durch Addition zusammengefasst.

4.4.4.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts: ORW

Die errechneten Resistenzwerte ergeben sich aus Tabelle 21 und Abb. 31.

Unterschiede zeigen sich nicht. Der Mittelwert (\bar{x} ; SD; alle 4 Gruppen) lag bei $\bar{x} = 81,58 \pm 7,82$.

**Tab. 21: Spermathekeninhalt: HOS;
ORW (Osmotischer Resistenzwert [0-100 Pkt.], \bar{x} ; SD)**

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	83,563	80,971	80,675	81,107
SD	8,599	5,923	10,381	6,386
Anzahl Königinnen n	24	17	20	13
Einfü.	Pufferver.	n.s.		
	Eidottzus.	n.s.		
	Interaktion	n.s.		

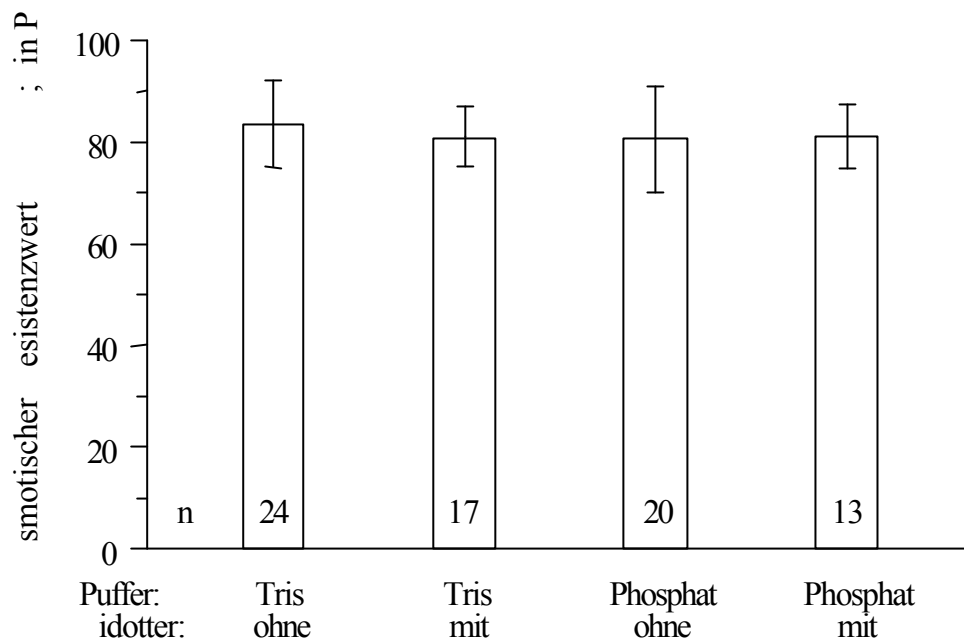


Abb. 31: Spermathekeninhalt: HOS; Osmotischer Resistenzwert ($\bar{x} \pm SD$) in Pkt.

4.4.4.2 Untersuchung des Frischspermas: ORW [0-100 Pkt.]

Tab. 22: Frisch gemischtes Sperma; Osmotischer Resistenzwert (\bar{x} ;SD)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	79,92	83,25	81,75	84,17
SD	2,754	2,839	2,817	2,742
Anzahl Proben n	3	3	3	3
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Unterschiede konnten nicht festgestellt werden; über alle Gruppen ergab sich ein mittlerer ORW von $82,27 \pm 2,788$.

4.4.5 Gefasertes mittlerer Schwanz-Bereich (gefMSB)

Als Zufallsbeobachtung bei Durchführung des HOS ergaben sich die Befunde „gefaserter MSB“ und „gefaserter vorderer Schwanz-Bereich (gefVSB)“. Sie wurden als eigene Parameter getrennt erfasst.

4.4.5.1 Untersuchungen des Spermathekeninhalts: Gefasertes mittlerer Schwanz-Bereich (gefMSB)

Die Untersuchung erfolgte an den in Kap.4.1.1 genannten 74 Spermaproben. Tabelle 21 und Abbildung 32 fassen die Untersuchungsergebnisse zusammen.

Tab. 23: Spermathekeninhalt: HOS; Anteil der Spermien mit dem Merkmal „gefaserter MSB“ in % (\bar{x}_g /SF)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g		5,984	4,083	3,228	4,842
SF		2,767	2,636	3,396	2,944
Anzahl Königinnen n		24	17	20	13
EinflFa.	Pufferver.	n.s.			
	Eidottzus.	n.s.			
	Interaktion	n.s.			

Der Anteil an Spermien mit gefasertem MSB schwankte zwischen 3,23 und 5,98 %; signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

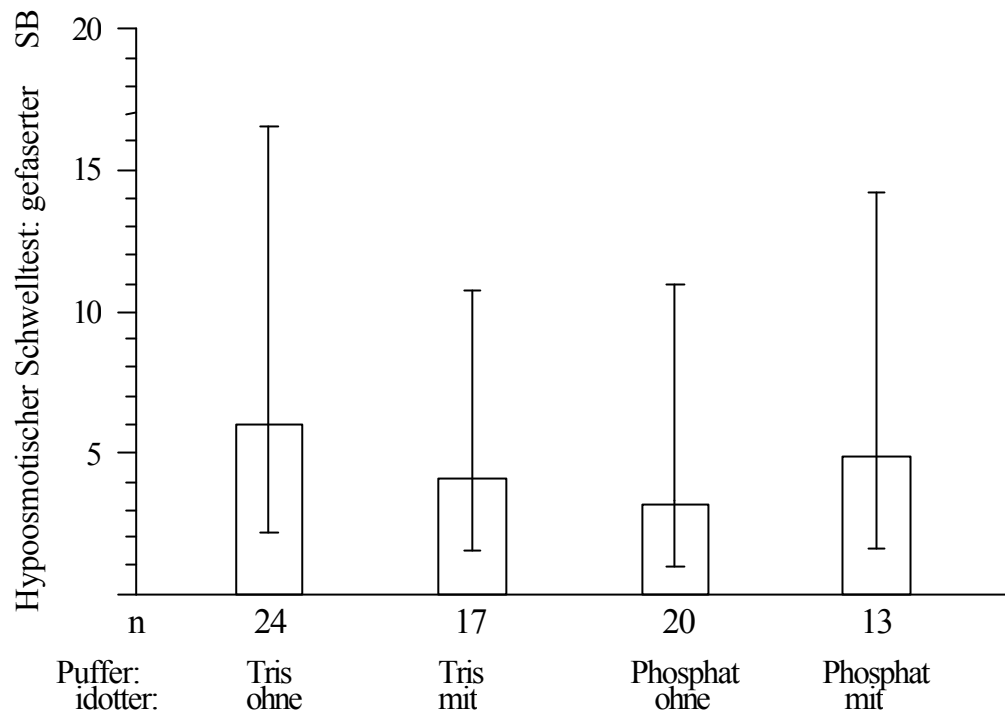


Abb. 32: Spermathekeninhalt: HOS; Anteil (%) der Spermien mit dem Merkmal „gefaserter MSB“ ($\bar{x}_g \pm 1$)

4.4.5.2 Untersuchung des Frischspermas: Gefaserter mittlerer Schwanz-Bereich (gefMSB)

Die Begutachtung des frisch gemischten Spermas erfolgte an den unter Kap. 4.1.1 genannten 12 Spermaproben.

Tab. 24: Frisch gemischtes Sperma; Anteil (%) der Spermien mit dem Merkmal „gefaserter MSB“ (\bar{x} ;SD)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	2,83	2,58	1,50	2,50
SD	1,70	0,29	0,75	1,25
Anzahl Proben n	3	3	3	3
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Der Anteil an Spermien mit gefasertem MSB schwankte zwischen 1,50 und 2,83 %; signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

4.4.6 Gefaserter vorderer Schwanz-Bereich (gefVSB)

4.4.6.1 Untersuchung des Spermathekeninhalts: Gefaserter VSB

Die Untersuchung erfolgte an den in Kap.4.1.1 genannten 74 Spermaproben. Tabelle 25 und Abbildung 33 fassen die Untersuchungsergebnisse zusammen;

Tab. 25: Spermathekeninhalt: HOS; Anteil der Spermien mit dem Merkmal „gefaserter VSB“ in % (\bar{x}_g /SF)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g	4,592	4,093	4,887	3,954
SF	2,799	2,884	2,270	2,786
Anzahl Königinnen n	24	17	20	13
Einfü.	Pufferver.	n.s.		
	Eidottzus.	n.s.		
	Interaktion	n.s.		

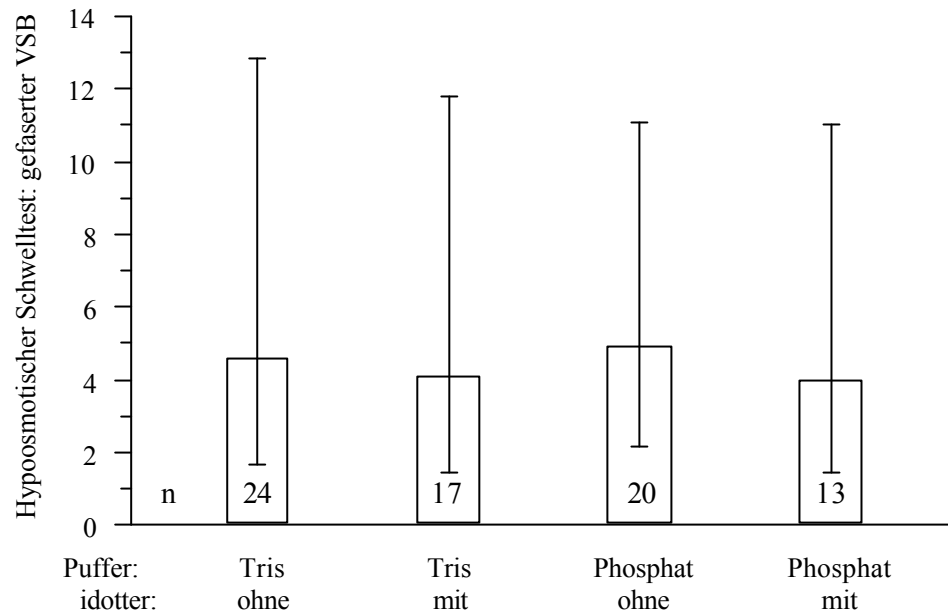


Abb. 33: Spermathekeninhalt: HOS; Anteil (%) der Spermien mit dem Merkmal „gefaserter VSB“ ($\bar{x}_g \pm SF$)

Tendenziell deutet sich eine Häufung des Merkmals bei den Puffern ohne Eidotterzusatz an, signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht.

4.4.6.2 Untersuchung des Frischspermas: Gefaseter vorderer Schwanz-Bereich (gefVSB)

Die Begutachtung des frisch gemischten Spermas erfolgte an den unter Kap. 4.1.1 genannten 12 Spermaproben.

Tab. 26: Frisch gemischtes Sperma; Anteil (%) der Spermien mit dem Merkmal „gefaserter VSB“ (\bar{x} ;SD)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}	1,92	1,67	0,75	1,42
SD	1,67	0,38	0,75	0,95
Anzahl Proben n	3	3	3	3
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Der Anteil an Spermien mit gefasertem vorderen Schwanzbereich lag bei durchschnittlich 1,44 % \pm 0,94%; es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

4.5 Anzahl der Spermien in der Spermatheka

Für diese Untersuchung wurden die 74 Königinnen präpariert und die Zahl der in der Spermatheka enthaltenen Spermien bestimmt; das Ergebnis zeigen Tabelle 27 und Abb. 34.

Tab. 27: Anzahl der Spermien (Mio.) pro μ l Spermathekeninhalt (\bar{x}_g /SF)

	Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g	0,195	1,117	0,881	1,100
SF	3,606	1,422	2,858	1,545
Anzahl Königinnen n	24	17	20	13
Einfü.	Pufferver.	p = 0,0015		
	Eidottzus.	p < 0,0001		
	Interaktion	p = 0,0012		

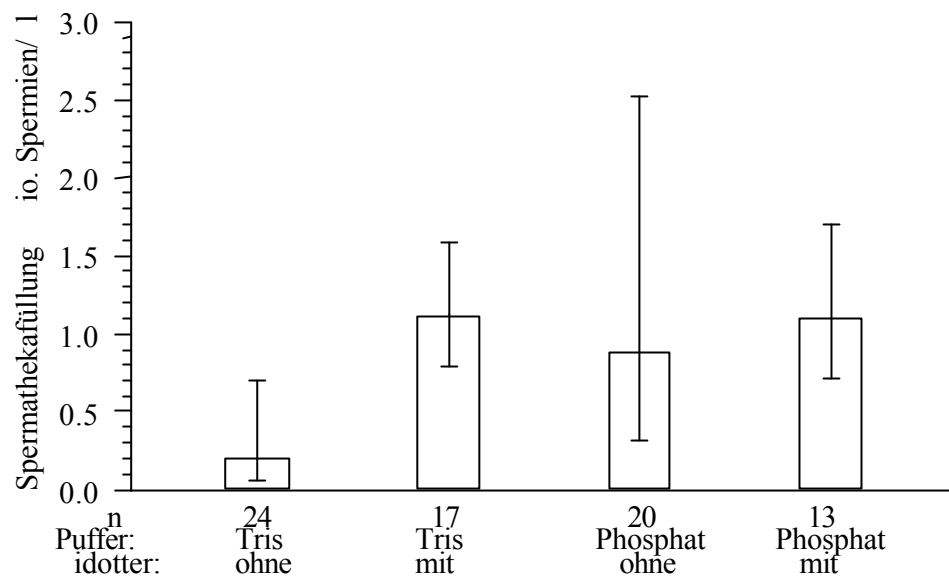


Abb. 34: Mittlere Anzahl der Spermien (Mio.) pro µl Spermathekeninhalt ($\bar{x}_g \pm SF$)

Die Ergebnisse zeigen eine relativ niedrige Spermathekaufüllung, wobei die Gruppe mit dem Trispuffer ohne Eidotterzusatz durch die geringste Spermienkonzentration auffällt.

Der Einfluss des Puffers ist mit $p = 0,002$ hoch signifikant, d. h. bei Verdünnung mit Phosphatpuffer ergaben sich höhere Konzentrationen. Auch der Einfluss des Eidotterzusatzes ist mit $p < 0,0001$ (im Vergleich der Gruppe mit Eidotterzusatz zu der Gruppe ohne Eidotterzusatz) hoch signifikant; es kam zu einer deutlichen Erhöhung der Spermienzahl. Auch die Wechselbeziehung der Einflussfaktoren ist mit $p < 0,0012$ statistisch hoch abgesichert.

4.6 Dauer von der Besamung bis zum Beginn der Eiablage

Die bei den 82 besamten Königinnen erhaltenen Werte zeigen Tabelle 28 und Abbildung 35.

Tab. 28: Mittlere Dauer (in Tagen) von der Besamung bis zum Beginn der Eiablage (\bar{x}_g /SF)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
\bar{x}_g		9,506	6,281	8,831	6,902
SF		1,637	1,791	1,959	1,811
Anzahl Königinnen n		28	17	22	15
EinflFa.	Pufferver.	n.s.			
	Eidottzus.	p = 0,0147			
	Interaktion	n.s.			

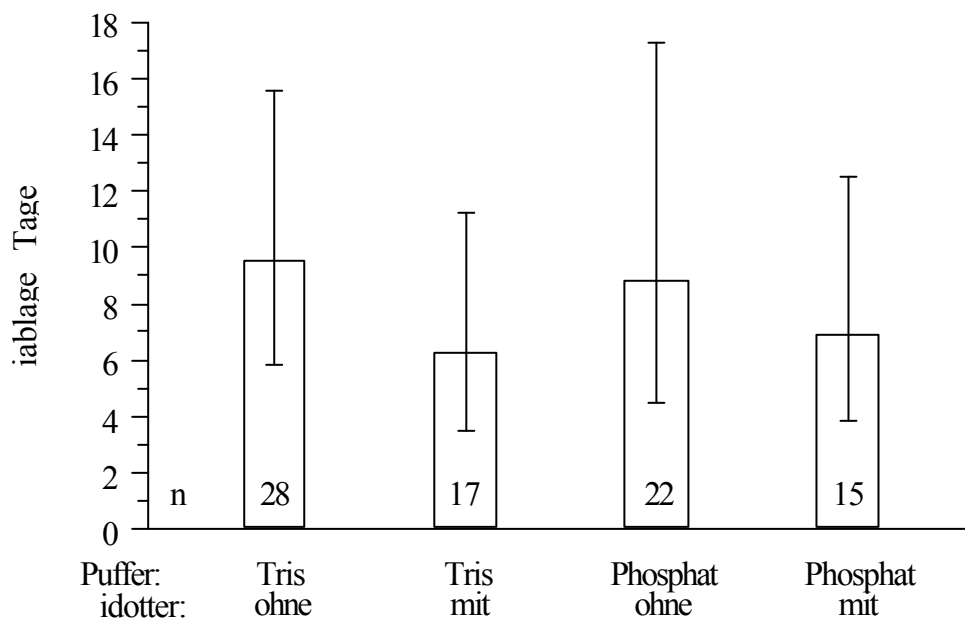


Abb. 35: Mittlere Dauer (in Tagen) von der Besamung bis zum Beginn der Eiablage (\bar{x}_g .SF \pm^1)

Der Effekt des Eigelbzusatzes war mit $p < 0,05$ signifikant, sowohl bei Tris- als auch bei Phosphatpuffer ergaben sich nach Eidotterzusatz kürzere Zeitspannen.

4.7 Brutentwicklung

Die Brutentwicklung wurde wie in Kap. 3.5 beschrieben am 3. Tag und am 14. Tag nach Eiablagebeginn an denselben 31 Völkern untersucht. Dabei ergab sich, dass in keiner Gruppe sowohl an Tag 3 als auch an Tag 14 Drohenbrut beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse sind in Tab. 29 und Abb. 36 dargestellt.

Tab. 29: Durchschnittlicher Brutausfall an Tag 3 nach Eiablagebeginn % (\bar{x}_g /SF)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
	\bar{x}_g	2,371	3,373	1,130	6,367
	SF	2,355	1,884	1,892	1,879
	Anzahl der untersuchten Völker n	8	8	6	9
Einfl.Fa.	Pufferver.	n.s.			
	Eidotztus.	$p = 0,0003$			
	Interaktion	$p = 0,0115$			

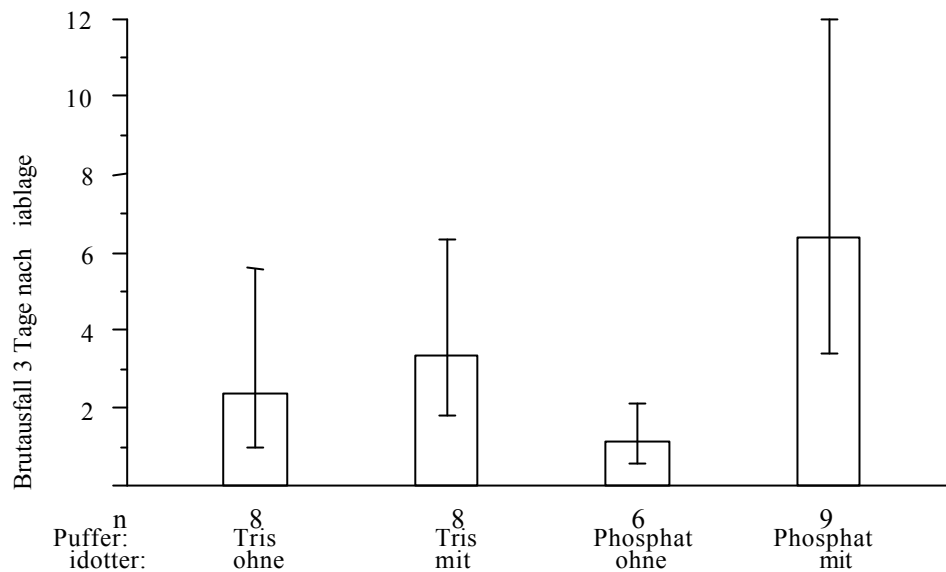


Abb. 36: Durchschnittlicher Brutausfall 3 Tage nach dem Eiablagebeginn ($\bar{x}_g \pm SF$)

Die Effekte des Eidotterzusatzes war mit $p < 0,01$ hoch signifikant. Der Brutausfall war bei der Phosphatpuffer-Gruppe geringer als bei der Trispuffer-Gruppe; er wurde durch den Eidotterzusatz erhöht.

Wie aus Tab. 30 und Abb. 37 hervorgeht, ergaben sich 14 Tage nach dem Eiablagebeginn ähnliche Beobachtungen wie nach 3 Tagen (Tab. 29 und Abb. 36), die Unterschiede waren jedoch nicht mehr signifikant.

Bei dieser Untersuchung konnten 2 Völker in der Statistik nicht berücksichtigt werden, da sie von anderen Insekten ihres Nahrungsvorrates und ihrer Brut beraubt worden waren und keinen Nachwuchs aufziehen konnten.

Tab. 30: Durchschnittlicher Brutaufschlag 14 Tage nach dem Eiablagebeginn in % (\bar{x}_g /SF)

		Trispuffer ohne Dotter	Trispuffer mit Dotter	Phos.-Puffer ohne Dotter	Phos.-Puffer mit Dotter
	\bar{x}_g	3,673	2,553	2,460	3,266
	SF	1,614	2,183	1,807	1,982
	Anzahl der untersuchten Völker n	7	8	6	8
Einfl.Fa.	Pufferver.	n.s.			
	Eidotterzus.	n.s.			
	Interaktion	n.s.			

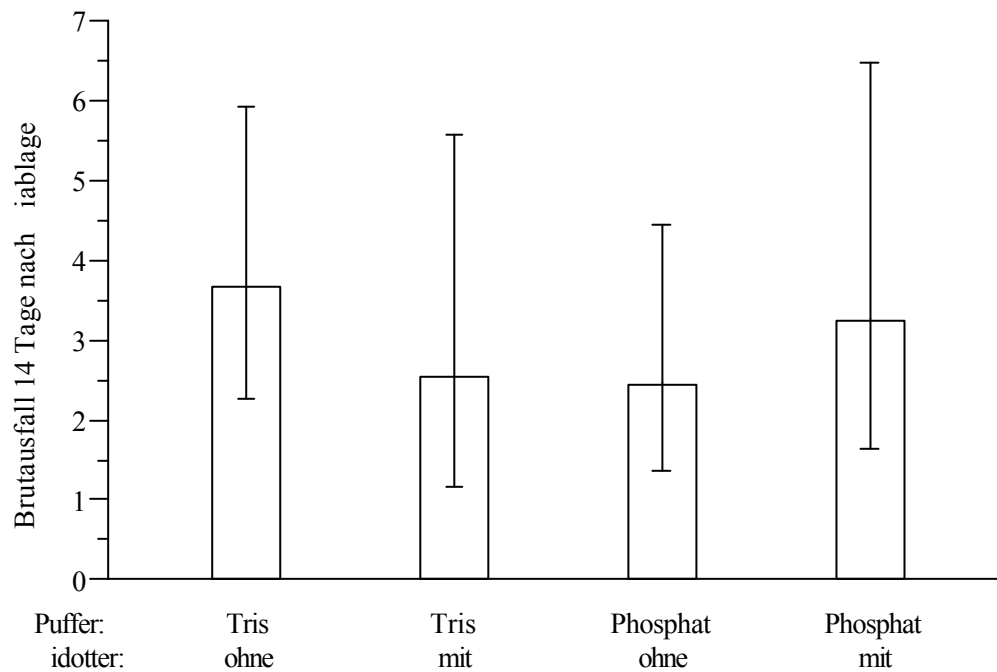


Abb. 37: Durchschnittlicher Brutaufschlag 14 Tage nach dem Eiablagebeginn (\bar{x}_g .SF ± 1) in %

4.8 Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse

Tab. 31: Übersicht: Einfluss von Puffer und Eidotter auf die Parameter Spermienanzahl, Anfangsaktivität/Motilität, Lebendfärbung und ORW bei Untersuchungen des Spermathekeninhalts

Untersuchungs-Merkmal		PUFFER				Signifikante Einflussfaktoren ($p \leq 0,05$)
		Tris	Tris mit Eidotter	Phos.	Phos. mit Eidotter	
Spermien-Anzahl (Mio/ μ l)	\bar{x}_g	0,195	1,117	0,881	1,100	Puffer Eidotter
	SF	3,606	1,422	2,858	1,545	
Anfangsaktivit. [0-4]	\bar{x}_g	0,818	1,294	0,537	0,675	Puffer Eidotter
	SF	1,905	1,862	1,377	1,807	
Motilität [0-4]	\bar{x}_g	0,643	0,916	0,395	0,430	Puffer
	SF	1,914	2,307	1,500	1,964	
Fluoreszenz-färbung (Anteil lebender Spermien in %)	\bar{x}	33,066	44,830	47,609	49,974	keine ¹⁾
	SD	22,434	16,856	22,372	21,347	
Osmotischer Resistenzwert [0-100]	\bar{x}	83,563	80,971	80,675	81,107	keine
	SD	8,599	5,923	10,381	6,386	

1) Effekt des Puffers: $p = 0,0542$

Aus Tabelle 31 ergibt sich, dass die Art des Puffers und des Eidotterzusatzes des Osmotischen Resistenzwert nicht beeinflussen.

Bei der Anzahl lebender Spermien war der Effekt des Puffers knapp unterhalb des Signifikanzniveaus mit der Tendenz, dass bei Verwendung von Phosphatpuffer die Anzahl lebender Spermien höher war.

Hochsignifikant war der Effekt von Puffer auf die Spermienanzahl mit einem höheren Wert für Phosphatpuffer; der ebenfalls hochsignifikante Effekt von Eidotter zeigte sich unabhängig vom Puffer.

Bei Anfangsaktivität und Motilität ergaben sich bessere Werte für den Trispuffer; ein positiver Effekt von Eidotter konnte für beide Puffer und die Anfangsaktivität festgestellt werden.

Es fällt auf, dass sich für fast alle Parameter eine schiefe Verteilung ergab, so dass für die statistische Auswertung außer bei der Lebendfärbung und dem Osmotischen Resistenzwert der geometrische Mittelwert und der Streufaktor berechnet werden mussten.

Wie Tabelle 32 zeigt, ergab sich bei Untersuchung von Frischsperma kein Einfluss auf Puffer und Eidotterzusatz. Alle Werte waren normal verteilt.

Tab. 32: Übersicht: Einfluss von Puffer und Eidotter auf die Parameter Anfangsaktivität/Motilität, Lebendfärbung und ORW bei Untersuchungen des Frischspermas

Untersuchungs-Merkmal		PUFFER				Signifikante Einflussfaktoren ($p \leq 0,05$)
		Tris	Tris mit Eidotter	Phos.	Phos. mit Eidotter	
Anfangsaktivit. [0-4]	\bar{x} SD	1,467 0,115	1,333 0,416	0,933 0,416	1,400 0,400	keine
Motilität [0-4]	\bar{x} SD	0,600 0,200	0,533 0,306	0,267 0,115	0,733 0,115	keine
Fluoreszenz-färbung (Anteil lebender Spermien in %)	\bar{x} SD	54,503 23,030	49,31 5,458	50,75 10,168	53,107 6,667	keine
Osmotischer Resistenzwert [0-100]	\bar{x} SD	79,92 2,754	83,25 2,839	81,75 2,817	84,17 2,742	keine

Tab. 33: Einfluss von Puffer und Eidotterzusatz auf die Dauer von der Besamung bis zum Beginn der Eiablage und die Brutentwicklung 3 und 14 Tage nach der instrumentellen Besamung

Untersuchungs-Merkmal		PUFFER				Signifikante Einflussfaktoren ($p \leq 0,05$)
		Tris	Tris mit Eidotter	Phos.	Phos. mit Eidotter	
Dauer bis zum Eiablagebeginn (Tage)	\bar{x}_g	9,506	6,281	8,831	6,902	Eidotter
	SF	1,637	1,791	1,959	1,811	
Brutausfall 3 Tage nach der i. Besamung (%)	\bar{x}_g	2,371	3,373	1,130	6,367	Eidotter $p = 0,0003$
	SF	2,355	1,884	1,892	1,879	
Brutausfall 14 Tage nach der i. Besamung (%)	\bar{x}_g	3,673	2,553	2,460	3,266	keine
	SF	1,614	2,183	1,807	1,982	

Tabelle 33 zeigt, dass ein Zusatz von Eidotter die Zeitspanne von der Besamung bis zum Beginn der Eiablage signifikant um 2-3 Tage verkürzte. Der Eidotter-Zusatz beeinflusste den Brutausfall nach 3 Tagen signifikant; nach 14 Tagen war dieser Effekt nicht mehr vorhanden.

4.9 Korrelationsanalysen

4.9.1 Spermatheka-Spermien: Anfangsaktivität und Motilität

Tab. 34: Korrelationen „Anfangsaktivität“ getrennt nach Gruppen

Parameter x	Parameter y	Gruppe	p-Wert	r-Wert
Anfangsaktivität	Motilität	Tris	<0,001	0,938
„	„	Tris + Eidotter	<0,001	0,968
„	„	Phosphat	<0,001	0,752
„	„	Phos.+ Eidotter	<0,001	0,874

Wie Tab. 34 zeigt, waren die Parameter Anfangsaktivität und Motilität hoch-signifikant korreliert.

4.9.2 Spermatheka-Spermien:

Lebende Spermien und Gesamt-Motilität, Spermathekafüllung und Dauer bis zur Eiablage

Tab. 35: Korrelationen „Anteil lebender Spermien in der Spermatheka“ (Parameter x) mit den Parametern „Gesamt-Motilität“ (y1), „Dauer bis zur Eiablage“ (y2) und „Gesamtzahl Spermien in der Spermatheka (SpThekFüll)“ (y3)

Parameter x	Parameter y	Gruppe	p-Wert	r-Wert
lebende Spermien (%)	Gesamt-Motilität	Tris	n.s.	0,160
„	„	Tris + Eidotter	n.s.	0,239
„	„	Phos	n.s.	0,031
„	„	Phos + Eidotter	0,017	0,645
„	Dauer (d) bis zur Eiablage	Tris	n.s.	-0,148
„	„	Tris + Eidotter	0,043	-0,495
„	„	Phos	0,019	-0,519
„	„	Phos + Eidotter	n.s.	-0,327
„	SpThekFüll	Tris	n.s.	-0,036
„	„	Tris + Eidotter	n.s.	0,007
„	„	Phos	n.s.	0,188
„	„	Phos + Eidotter	0,050	0,552

Bei dem Parameter „Gesamt-Motilität“ wurde der arithmetische Mittelwert der beiden Parameter „Anfangsaktivität“ und „Motilität“ gebildet.

Tab. 35 zeigt, dass der Parameter „lebende Spermien (%)“ in der Spermatheka nur in wenigen Fällen signifikant mit den anderen Parametern korrelierte. Lediglich

bei der Gruppe „Phosphatpuffer mit Eidotter“ ergibt sich eine positive Korrelation mit den Parametern „Gesamt-Motilität“ und „Spermathekaufüllung“.

Auffallend sind die negativen Regressionskoeffizienten bei Berechnung der Korrelation „lebende Spermien (%)“ und „Dauer bis zur Eiablage“ (zweimal signifikant) in den Gruppen „Trispuffer mit Eidotterzusatz“ und „Phosphatpuffer ohne Eidotterzusatz“. Daraus ergibt sich, dass die Dauer bis zur Eiablage umso kürzer ist, je höher der Anteil lebender Spermien ist.

4.9.3 Dauer bis zum Eiablagebeginn und Spermathekaufüllung

Tab. 36: Korrelationen „Dauer (in Tagen) bis zum Eiablagebeginn“ und Spermathekaufüllung

Parameter x	Parameter y	Gruppe	p-Wert	r-Wert
Eiablagebeginn	SpThekFüll	Tris	n.s.	0,146
„	„	Tris + Eidotter	n.s.	0,176
„	„	Phos.	0,017	-0,527
„	„	Phos. + Eidotter	n.s.	-0,170

Wie Tab. 36 zeigt, gibt es zwischen der Dauer bis zur Eiablage und der Spermathekaufüllung nur für die Phosphatpuffer-Gruppe ohne Eidotterzusatz eine gesicherte, negative Korrelation; d. h. mit zunehmender Spermathekaufüllung wird bei Verwendung von Phosphatpuffer die Dauer bis zum Beginn der Eiablage kürzer.

5 Diskussion

Die instrumentelle Besamung ist auch bei der Zucht und Haltung von Bienen ein heute nicht mehr wegzudenkendes Verfahren. Ihr Vorteil wird vor allem darin gesehen, dass Königinnen mit dem Sperma von ausgewählten Drohnen besamt werden können (MACKENSEN 1964, 1969).

Mit Einführung der Spermamischmethode von MORITZ (1983), in der das Sperma mehrerer Drohnen vor der Versamung gemischt wird, können definierte Anteile an Drohnen-Sperma verwendet und die Anzahl von Drohnen-Vätern beliebig gewählt werden.

Ein anderer Vorteil der künstlichen Besamung besteht darin, dass beliebig viele Königinnen gleich angepaart werden können und so Zuchtleistungsprüfungen möglich sind. Auch kann der Inzuchteffekt (s. Kap. 2) möglichst gering gehalten werden.

Im Vergleich zur natürlichen Paarung machen sich jedoch folgende Nachteile bemerkbar:

Es ist weiterhin fraglich, ob die Anzahl der in der Spermatheka befindlichen Spermien nach der natürlichen Paarung auch nach der instrumentellen Besamung erreicht wird.

Weiterhin wird über relativ hohe Ausfallquoten der Königinnen in den ersten zwei Jahren nach der Besamung mit der Spermamischmethode (BÜCHLER 1997, pers. Mitteilung) berichtet.

Einer der Gründe wird in der Aufbereitung und damit Qualität des versamten Spermas gesehen. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, die Eignung zweier Verdünnermedien (Phosphat- und Trispuffer) ohne und mit Eidotterzusatz zu überprüfen. In Verbindung damit sollte weiter untersucht werden, inwieweit bisher zur Beurteilung der Qualität von Säugetiersperma geeignete Verfahren auch auf Bienensperma übertragbar sind.

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Allgemeine Verfahren und Versuchsaufbau

Die Handhabung der Bienen (Königinnen, Drohnen), Gewinnung und Technik der Versammlung des Spermas entsprachen allgemein üblichen und im HDLGN (Hessischen Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz) etablierten Verfahren. Dies gilt auch für die Beurteilung des Bruterfolges.

Grundsätzlich wurden die Untersuchungen an einem ausreichend umfangreichen Probenmaterial durchgeführt, um aussagefähige, statistisch abgesicherte Ergebnisse zu erhalten. Lediglich die Untersuchungen von Frischsperma (s. Kap. 3.8) musste aufgrund praktisch-zeitlicher Gegebenheiten auf 3 Stichproben pro Gruppe (Puffer) reduziert werden. Die Aussagekraft der durchgeführten statistischen Berechnungen ist daher eingeschränkt.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben sich in Abhängigkeit von den 4 Einflussgrößen: Gruppe 1: Tris-Puffer, Gruppe 2: Phosphat-Puffer, Gruppe 3: Tris-Puffer mit Eidotterzusatz, Gruppe 4: Phosphat-Puffer mit Eidotterzusatz.

Dabei handelte es sich bei dem Tris-Puffer um einen üblichen, für die Verdünnung von Bienensperma verwendeten Puffer, der im vorliegenden Falle als Kontrolle diente. Die Verwendung des Sorensen Phosphat-Puffers ergab sich aufgrund erster positiver Test-Versuche (KAHN, 1999, pers. Mitteilung), während der Eidotterzusatz in Anlehnung an dessen Verwendung bei Säugetiersperma erfolgte. Dabei lag die Überlegung zugrunde, dass die kryoprotektive Wirkung bei Säugetierspermien, die sich aus der membranprotektiven Wirkung ergibt, auch bei den Bienen ein erwünschter Effekt sein könnte.

Als poikilothermes Tier sind Bienen großen Temperaturschwankungen ausgesetzt, wobei sich die Notwendigkeit ergibt, dass das in der Spermatheka gelagerte Sperma über bis zu 5 Jahre seine Funktion aufrecht erhalten muss.

Dem Versuchsdesign lag weiterhin zugrunde, dass zur Erfassung von Langzeiteffekten die identischen Untersuchungen mit „Frischsperma“ und Sperma aus den Spermatheken, die 8-9 Wochen nach der instrumentellen Besamung den Königinnen entnommen worden waren, durchgeführt wurden.

Auch sollte die Fragestellung beleuchtet werden, ob und inwieweit sich Beziehungen zwischen der „Spermaqualität“ und den Zielgrößen „Dauer von der instrumentellen Besamung bis zur Eiablage“, „Brutentwicklung“ und „Füllungszustand der Spermatheka 8-9 Wochen nach der instrumentellen Besamung“ ergaben.

5.1.2 Verfahren zur Beurteilung der Spermienqualität

5.1.2.1 Anfangsaktivität und Motilität

Auch Bienenspermien weisen eine zielgerichtete Vorwärtsbewegung bei Verbringung in Verdünnerlösung auf (LENSKY und SCHINDLER, 1967), die als klassischer Parameter in die Untersuchungen einging. Die Anfangsaktivität charakterisiert dabei die Vorwärtsbeweglichkeit der Nativprobe, d. h. entweder die des frisch hergestellten Mischspermas oder die des frisch entnommenen Spermatheka-Inhaltes, nachdem diese auf dem Objektträger mit einem Puffertropfen überschichtet worden war. Es wurde die Grenze des Spermatropfens mit dem Puffer und damit das Einwandern der Spermien in den Verdünner begutachtet.

Die Motilität charakterisiert die Vorwärtsbeweglichkeit der gleichen Probe 2 Minuten nach Durchmischung mit einem Tropfen des entsprechenden Puffers.

Anfangsaktivität und Motilität wurden subjektiv nach einem 5-Punkte-Schema beurteilt. Da die Beurteilung stets von derselben Person vorgenommen wurde, ist die Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse gewährleistet.

Erwartet wurde eine gleichgerichtete Beobachtung, Abweichungen davon würden auf einen experimentellen Fehler oder – bei Spermatheka-Spermien – auf eine

alterungsbedingte und/oder schnell eintretende Stoffwechselreaktion nach Re-/Exposition mit dem Puffer hinweisen (VERMA, 1973).

5.1.2 Lebend-Tot-Färbung

In Analogie zur Untersuchung von Säugetierspermien (CROSS et al., 1986; PINTADO et al., 2000, und RIESENBECK et al., 2001) kam die Fluoreszenzfärbung mit Bisbenzimid (HOECHST 22358) zur Anwendung. Bei Drohnensperma waren bisher andere Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR-14 mit Propidium-Iodid (COLLINS und DONOGHUE, 1998) und ein Bisbenzimidol-Derivat - HOECHST 33342 – , kombiniert mit Propidium-Iodid, (LOCKE, 1990) erprobt.

Wie die durchgeführten Vorversuche ergaben, konnte aufgrund der deutlich unterschiedlich ausgeprägten Fluoreszenz (lebende Spermien schwache, tote Spermien intensive Fluoreszenz, s. Abb. 17, S. 34) problemlos zwischen lebenden und toten Spermien unterschieden werden. Damit konnte die Eignung dieses Fluoreszenzfarbstoffs für Bienenspermien aufgezeigt werden.

5.1.2.3 Hypoosmotischer Schwelltest

Der HOS gilt als ein relativ neues, die Intaktheit der Membran von Säugetierspermien charakterisierendes Verfahren (JEYENDRAN et al., 1984; RIESENBECK et al., 2001). Erfahrungen mit Bienensperma lagen bisher nicht vor. Die durchgeführten Untersuchungen haben erstmals gezeigt, dass auch mit Bienensperma charakteristische „Aufrollreaktionen“ auftreten. Wie Abb. 19, Kap. 3.8.3, zeigt, kann dabei zwischen dem vorderen, mittleren und hinteren Schwanzbereich unterschieden werden.

Da derzeit allerdings keine Aussage gemacht werden kann, ob es sich bei dieser unterschiedlichen Lokalisation der Aufrollung um qualitative Unterschiede handelt, wurden zur Berechnung des ORW diese Veränderungen additiv zusammengefasst.

Bei Durchführung des HOS zeigte sich weiterhin, dass vorher nicht in Erscheinung tretende Ausfaserungen im Schwanzbereich sichtbar wurden. Ob es sich dabei

um Artefakte handelt oder bereits um vorliegende und erst durch den HOS-Test erkennbare pathomorphologische Veränderungen des Spermischwanzes, kann derzeit nicht beurteilt werden.

Die diesbezüglich in der vorliegenden Arbeit festgestellten Befunde sind demnach zunächst lediglich deskriptiv.

5.1.2.4 Auszählung der Spermien

Die Auszählung der Spermien erfolgte mit Hilfe der Bürker-Zählkammer, wobei, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, die an der HDLGN praktizierte Methode zur Anwendung kam.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Ergebnisse bei Untersuchung von Frischsperma

Wie die Tabellen 10, 12, 14, 22 sowie zusammenfassend Tab. 32 zeigen, konnte, gemessen an den Parametern Anfangsaktivität, Motilität, Anteil lebender Spermien sowie ORW, kein Effekt des Puffers festgestellt werden. Dies gilt auch für den Zusatz von Eidotter.

Diesen Beobachtungen liegt jedoch eine nur kurze Expositionszeit zugrunde, so dass die Parameter „Dauer von der instrumentellen Besamung bis zur Eiablage“ und „Brutentwicklung“ möglicherweise eher auf Effekte der Variablen „Puffer“ und „Eidotterzusatz“ schließen lassen (s. auch Kap. 5.2.3.2 und 5.2.3.3).

5.2.2 Ergebnisse bei Untersuchung des Spermatheka-Inhaltes

5.2.2.1 Anfangsaktivität und Motilität

Beide Parameter wiesen entsprechend den Erwartungen eine hohe, positive Korrelation auf ($p < 0,001$, s. Tab. 34, S. 72).

Weiterhin zeigte sich hinsichtlich der Anfangsaktivität ein signifikanter Effekt der Variablen „Puffer“ und „Eidotter“ (Tab. 31, S. 70). So war die Vorwärtsbeweglichkeit bei Phosphat-Puffer geringer als bei Tris-Puffer, der Zusatz von Eidotter führte zu einer Verbesserung dieses Parameters. Anders als der Puffereffekt war der Eidottereffekt 2 Minuten später nicht mehr erkennbar. Diese Beobachtungen gehen zunächst mit den Ergebnissen von VERMA (1978) konform, der nach Zusatz von Aminosäuren zu Bienensperma eine verbesserte Vorwärtsbeweglichkeit beobachtet. Anschließend reagieren Drohnen-Spermien ähnlich wie Säugetierspermien, die durch ein Lipoprotein niedriger Dichte (WATSON, 1976) einen Schutz bei der Kryokonservierung erfahren; die Schutzkolloide aber schränken die Spermienbeweglichkeit und den Stoffwechsel ein und fördern eine lebenserhaltende Anabiose (BUSCH et al., 1991).

Dies erklärt, warum der Eidotter-Effekt innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 2 Minuten verschwindet oder allenfalls nur noch der Tendenz nach erkennbar ist.

Zusätzliche Gründe könnten in der Aufbewahrungstemperatur (25° C) und dem damit verbundenen Energieverbrauch liegen.

5.2.2.2 Anteil lebender Spermien

Der Anteil lebender Spermien schwankte zwischen 33 und 50 % ($\bar{x} \pm SD$); er war damit der Tendenz nach geringer als bei der Untersuchung von Frischsperma, wo sich über die Gruppen hinweg ein Mittelwert von 51,18 % ($\pm 11,33$ %) ergab.

Es zeigte sich für das Spermatheka-Sperma ein an der Signifikanzgrenze liegender Einfluss des Puffers, der darauf schließen lässt, dass bei Verdünnung mit Phosphatpuffer die Verlustrate geringer ist. Wird diesem Eidotter zugesetzt, verschwindet der Unterschied zu Frischsperma. Nur für diese Gruppe ergab sich auch eine positive Korrelation zu den Parametern „Spermathekafüllung“ und „Gesamt-Motilität“ (s. Tab. 35, S. 73).

Diese Beobachtungen bestätigen (BUSCH et al., 1991) die protektive Wirkung von Eidotter und weist den Phosphatpuffer als ein besseres Verdünnungsmedium als den Trispuffer aus.

Obwohl nur für 2 Gruppen signifikant (Trispuffer mit Eigelbzusatz und Phosphatpuffer), ergibt sich für alle Versuchsgruppen eine negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil lebender Spermien und der Dauer bis zum Beginn der Eiablage. Daraus könnte abgeleitet werden, dass der frühe Beginn der Eiablage an den Anteil lebender Spermien gebunden ist; eine initial hohe Überlebensrate scheint demnach wichtig zu sein. Eine klare Zuordnung erfordert jedoch weiterführende Untersuchungen.

5.2.2.3 Hypoosmotischer Schwelltest

Der HOS und der daraus abgeleitete ORW war unabhängig von der Versuchsgruppe und dem untersuchten Sperma (Frischsperma, Spermatheka-Sperma; Tab. 31 und 32) und lag im Mittel bei 81,93 % (\pm SD = 7,82). Diese Beobachtung lässt es zunächst als zumindest fraglich erscheinen, ob der bei der Beurteilung von Säugetierspermien bewährte Test (Humansperma: JEYENDRAN et al., 2000; Rüdensperma: RIESENBECK et al., 2001; Ebersperma: LEIDINGER-KREILAUS, 1998) auch zur Beurteilung von Bienensperma geeignet ist. Obwohl eindeutige HOS-bedingte Reaktionen beobachtet werden konnten (Abb. 19, Kap. 3.8.3), ist es fraglich, ob aufgrund des speziellen Aufbaus eines Bienenspermiums den im vorderen, mittleren und hinteren Schwanzbereich gemachten Beobachtungen die gleiche funktionelle Bedeutung zukommt.

Dies weist auf die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen an standardisierten und ggf. artifiziell vorgeschädigten Bienenspermien hin.

5.2.3 Ergebnisse der anderen Zielgrößen

5.2.3.1 Füllung der Spermatheka

Es zeigten sich hochsignifikante Effekte von Puffer- und Eidotterzusatz (s. Tab. 29, Kap. 4.8). Der als Verdünner verwendete Phosphatpuffer führte zu einer höheren Füllung als der Trispuffer; bei beiden Puffern ergab sich eine zusätzliche Erhöhung bei Zusatz von Eidotter. Auch dieser Befund weist auf die Überlegenheit der Kombination Phosphatpuffer und Eidotterzusatz hin. Für diese Gruppe ergab sich auch eine positive Korrelation zum Anteil lebender Spermien (Tab. 35).

Das Volumen der Spermatheken differiert je nach Größe der Königinnen. Es wird mit 0,63 bis 0,98 mm³ angegeben (WOYKE und JASINSKI, 1973).

Bei natürlich begatteten Königinnen wird eine Spermatheka-Füllung von durchschnittlich 5,7 Mio. Spermien (MACKENSEN, 1959) bzw. 5,3 Mio. Spermien (WOYKE, 1962) angegeben. Diese wird durch äußere Einflüsse wie Größe der verfügbaren Drohnen-Population oder der Jahreszeit (HARIZANIS und GARY, 1984) beeinflusst.

In vorliegenden Untersuchungen war die Zahl der Spermien in der Spermatheka der mit Mischsperma instrumentell besamten Königinnen mit durchschnittlich (\bar{x}_g /SF) 0,84 / 2,33 Mio./ μ l. deutlich niedriger und auch niedriger, als sonst nach der künstlichen Besamung festgestellt wird. Auffällig war die deutlich geringere Spermathekaufüllung bei den Puffer-Gruppen ohne Eigelbzusatz.

5.2.3.2 Dauer bis zum Beginn der Eiablage

Hier zeigte sich, dass ein Zusatz von Eidotter die Zeitspanne von der instrumentellen Besamung bis zur Eiablage signifikant ($p < 0,05$) um 2-3 Tage verkürzte. Ein Effekt des Puffers zeigte sich nicht, allerdings die Tendenz zu einer kürzeren Zeitspanne bei Phosphatpuffer im Vergleich zu Trispuffer

(s. Tab. 28, Kap. 4.6). Die Erkenntnis, dass die Gruppen mit Eigelbzusatz schneller in Eiablage gegangen sind, könnte auf der Tatsache der erhöhten Spermiedichte in der Spermatheka beruhen. Schon FISCHER (1989) deutet einen solchen Zusammenhang an, kann ihn aber nicht signifikant belegen.

5.2.3.3 Brutentwicklung

Dem positiven Effekt des Eidotterzusatzes bei der Dauer bis zur Eiablage steht der negative Effekt eines erhöhten Brutaufalles am 3. Tag nach der instrumentellen Besamung gegenüber. 14 Tage nach der instrumentellen Besamung waren allerdings keine Unterschiede mehr feststellbar (Tab. 29 und 30, Kap. 4.7). Damit dürften die nach 3 Tagen gemachten Beobachtungen im Hinblick auf den Bruterfolg keine besondere Bedeutung beigemessen werden. Sie sprechen eher für eine kurzfristige Beeinflussung des Sozialverhaltens des Volkes aufgrund der Manipulation der Königin als für einen langfristigen, die Fortpflanzung betreffenden Effekt.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, den im allgemeinen bei der instrumentellen Besamung der Biene verwendeten Trispuffer (TP) gegen einen Phosphatpuffer (PP) nach Sorensen mit erprobten und neuen Untersuchungsmethoden auszutesten. Zusätzlich wurde der Effekt eines einprozentiger Eidotterzusatzes überprüft.

8-9 Wochen nach der instrumentellen Besamung wurde die Spermatheka der Königinnen freipräpariert, die Spermienzahl bestimmt und die Spermaqualität anhand der Motilität, der Integrität der Plasmamembran nach Anwendung des Hypoosmotischen Schwelltests und der Vitalitätsfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (HOECHST 33258) beurteilt. Der Hypoosmotische Schwelltest und der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid waren bisher nur an Säugetierspermien erprobt.

Bei der Untersuchung des Spermatheka-Inhaltes war der Effekt von Puffer- und Eidotterzusatz auf die Anzahl an Spermien und die Anfangsaktivität signifikant. So war die Gesamtzahl bei der Phosphatpuffer-Gruppe höher als bei der Trispuffer-Gruppe [0,881 (2,858) bzw. 0,195 (3,606); $\bar{x}_g(\text{SF})$], der Eidotterzusatz führte jeweils zu einer Erhöhung der Spermienzahl.

Die Anfangsaktivität war bei der Trispuffer-Gruppe besser ausgeprägt als bei der Phosphatpuffer-Gruppe; der Eidotterzusatz führte zu einer zusätzlichen Steigerung. Für die Motilität ergab sich ein entsprechender Effekt des Puffers. Keine Effekte zeigten sich auf die Anzahl lebender Spermien und den ORW. Die entsprechenden Untersuchungen von Frischsperma ließ keine Effekte der beiden Variablen erkennen.

Bei den Königinnen, die zur Eiablage kamen, erfolgte dies nach Zusatz von Dotter früher ($p < 0,05$) als ohne Zusatz (6,9 bzw. 8,8 Tage bei PP und 6,39 bzw. 9,5 Tage bei TP). Bei Erfassung der Brutentwicklung steigerte der Eidotterzusatz die

Verluste ($p < 0,0003$). Nach 14 Tagen war jedoch kein Unterschied mehr feststellbar.

Die Ergebnisse bestätigen die in den Vorversuchen festgestellte gute Eignung von Phosphatpuffer zur Verwendung bei der instrumentellen Besamung; sie weisen weiterhin auf einen positiven Effekt des Eidotterzusatzes hin.

7. Summary

The aim of this investigation was to compare the commonly used Tris buffer (TB) to a phosphate buffer (PB) as described by Sorensen in its suitability for artificial insemination of honey bee queens by applying standard and new test methods. Furthermore, the effects of a 1% yolk additive to both buffers were tested.

8-9 weeks after insemination, the spermathecae were taken out to investigate the number of sperms and their quality by assessing their motility, application of a hypoosmotic swelling test checking the integrity of the plasma membrane and by a vitality staining with the fluorescence dye Bisbenzimid (HOECHST 33258). The hypoosmotic swelling test and the fluorescent staining with Bisbenzimid so far were only used for mammalian spermatozoa.

The effect of buffer and egg yolk was highly significant on the total number of sperm and their initial motility. The total number was higher with PB compared to TB [0.881 (2.858 vs. 0.195 (3.606); \bar{x}_g (SF)], egg yolk led to an additional increase. Initial motility was higher in the case of TB; in both buffers egg yolk again led to an additional increase. Similar effects of buffer were observed for the motility. The % live spermatozoa and the ORW were not affected. When testing the same parameters with fresh spermatozoa no effect of other variables could be demonstrated.

Egg laying of successfully inseminated queens started earlier when yolk was added to the buffers (6.9 vs. 8.8 days in case of PB, 6.3 vs. 9.5 days in case of TB).

Addition of egg yolk increased ($p < 0.0003$) losses during brood development. However after 14 days there were no further differences.

In confirmation of preliminary data the obtained results show the suitability of PB. They further indicate a positive effect of the addition of egg yolk.

8 Literaturverzeichnis

ADAMS, J.; ROTHMANN, E. D.; KERR, W. E.; PAULINO, Z. L. (1977):

Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*.

Genetics, 86: 583-596

BACKES, M. (1988a):

Bestimmung der Spermindichte beim Drohnen (*Apis mel. L.*)

- ein Beitrag zur künstlichen Besamung von Nutztieren -

Diplomarbeit Agrarwissenschaften

Justus-Liebig-Universität Gießen

BACKES, M. (1989b):

Untersuchung der Dichte von Bienensperma.

Mitteilung Bienenbesamung, 1: 14-17

BACKES, M. (1989):

Verdünnern in der Königinnenbesamung.

Mitteilung Bienenbesamung, 2: 16-17

BISHOP, G. H. (1920):

Fertilization in the honey-bee.

The Journal of Experimental Zoology, 31: 225-285

BOLTON, A. B.; HARBO, J. R. (1982):

Numbers of spermatozoa in the spermatheca of the queen honeybee after multiple inseminations with small volumes of semen.

Journal of Apicultural Research, 21, 7-10

BRAUSSE, J. (1989):

pH-Wert-Messung von Ejakulat und Spermathekeninhalt.

GuK 23/89, 12

BUSCH, W.; LÖHLE, K.; PETER, W. (1991):

Künstliche Besamung bei Nutztieren

Fischer-Verlag, Stuttgart

CARMAGO, C. A. (1975):

Biology of the spermatozoa of *Apis mellifera*.

1. Influence of diluents and pH,

Journal of Apicultural Research, 14, 113-118

COLLINS, A. M.; DONOGHUE, A. M. (1998):

Viability assessment of honeybee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining.

Theriogenology 51, 1513-1523

CROSS, N. L.; MORALES, P. ; OVERSTREET, J. W. ; HANSON, F. W. (1986):

Two simple methods for detecting acrosomereacted human sperm

Gamete research, 15, 213-226

DIXON, W. J., (1993):

BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2.

University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London

EBADI, R. ; GARY, N. E. (1980):

Factors affecting survival, migration of spermatozoa and onset of oviposition
in: Instrumentally inseminated queen honey bees.

Journal of Apicultural Research, 19: 96-104

EISENSMITH, S. P. (1993):

PlotIT - Graphics & Statistics.

Scientific Programming Enterprises, Haslett, USA

EISENSMITH, S. P. (1994):

PlotIT for Windows.

Scientific Programming Enterprises, Haslett, USA

ESTAUP, A./ SOLIGNAC, M./ CORNUET, J.-M. (1994):

Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in
honeybee colonies.

Proc. R. Soc. Lond. B. 258: 1-7

FISCHER, F. (1989):

Untersuchungen zur Spermatomischtechnik und der Spermatbeurteilung bei der Besamung der Biene.

Dissertation Agr. Göttingen

GESSNER, B. ; RUTTNER, F. (1977):

Transfer der Spermatozoen in die Spermatotheka der Bienenkönigin.

Apidologie, 8: 1-18

HABERL, M. (1993):

Zum Einfluss der Besamungsreihenfolge auf die Vaterschaftsanteile bei den Nachkommen besamter Königinnen.

Mitteilung über Bienenbesamung, 2: 2-7

HARBO, J. R. (1971):

«Annotated Bibliography on Attempts at Mating Honey Bees in Confinement».

Bibliography No. 12, Bee Research Assn.,

Gerrards Cross, Bucks. England

HARBO, J. R. (1986):

Oviposition rates of instrumentally inseminated and naturally mated queen honey bees (Hymenoptera: *Apidae*).

Annals of the Entomological Society of America, 1: 112-115

HARIZANIS, P. C. ; GARY, N. E. (1984):

The quality of insemination of queen honey bees mated under commercial conditions.

American Bee Journal, 124: 385-387

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. (1990):

Use of fluorescent probes to assess membran integrity in mammalian spermatozoa

J. Reprod. Fertil. 88, 343-352

INFANTIDIS, M. D. (1972):

Einfluss von Aufzuchtbedingungen und Alter auf die Ausbildung von Spermien in der Honigbiene.

Bonn, Inauguraldissertation

JAMIESON, B. G. M. (1987):

The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa.

Cambridge university press, Cambridge

JAYCOX, E. R. (1960):

The effect of drying and various diluents on spermatozoa of the honey bee.

Journal of Economic Entomology, 53: 266-269

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.;

ZANEVELD, L. J. D (1984):

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.

J. Reprod. Fertil. 70: 219-228

KAFTANOLGLU, O.; PENG, Y. S. (1980):

A washing technique for collection of honey bee semen.

Journal of Apicultural Research, 19: 205-211

KAFTANOGLU, O.; PENG, Y. S. (1982):

The effects of insemination on the initiation of oviposition in queen honey bees (*Apis mellifera* L.).

Journal of Agricultural Research, 2: 3-6

KERR, W. E.; ZUCCHI, R.; NAKADAIRA, J. T.; BUTOLO, J. E. (1962):

Reproduction in the social bees.

Journal of the New York Entomology Society, 70: 265-285

KRAUSE, D. (1966):

Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Befunde.

Hannover, Habilitationsschrift

LAIDLAW, H. H. Jr. (1977):

Instrumental Insemination of honey bee queens: pictorial instructional manual.

Dadant & Sons, Inc., Hamilton, Illinois

LAIDLAW H. H.; PAGE, R. E. (1984):

Polyandry in honey bees (*Apis mellifera* L.) Sperm utilization and intracolony genetic relationships.

Genetics, 108: 985-997

LEIDINGER-KREILAUS, H. (1998):

Morphometrische, chemisch-physikalische und biochemische Untersuchungen an Ebersperma im Hinblick auf die Fruchtbarkeit.
Inaugural-Dissertation, Gießen

LENSKY, Y.; BEN-DAVID, E.; SCHINDLER, H. (1979):

Ultrastructure of the spermatozoon of the mature drone honeybee.
Journal of Apicultural Research, 18: 264-271

LENSKY, Y.; SCHINDLER, H. (1967):

Motility and reversible inactivation of honeybee spermatozoa in vivo and in vitro.
Annales de l'Abeille, 10: 5-16

LOCKE, S. J.; PENG, Y.-S.; CROSS, N. L. (1990):

A supravital staining technique for honeybee spermatozoa.
Physiological Entomology 15: 187-192

MACKENSEN, O. (1959):

Efficiency in artificial insemination of queens.
Amer. Com. Bee Research Assoc.

in: BUSCH, W.; LÖHLE, K.; PETER, W. (1991):

Künstliche Besamung bei Nutztieren
Fischer-Verlag, Stuttgart: 698-699

MACKENSEN, O. (1964):

Relation of semen volume to success in artificial insemination of queen honey bees.

Journal of Economic Entomology, 57: 581-583

MACKENSEN, O. (1969):

Effect of diluents and temperature on instrumental insemination of queen honey bees.

Journal of Economic Entomology, 62: 1370-1372

MCLAIN, N. M. (1886):

Report on experiments in apiculture.

in: Report of the U. S. Community of Agriculture: 583-591

MORITZ, R. (1983):

Homogenous mixing of honeybee semen by centrifugation.

Journal of Apicultural Research, 22: 187-192

MORITZ, R. (1984):

The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen.

Journal of Apicultural Research 23: 164-167

OEHM, U. (1991):

Morphologische, anatomische und andrologische Untersuchungen an Spermatozoen der Honigbiene (*Apis mellifera* L.).

Diplomarbeit Agrarwissenschaften

Justus-Liebig-Universität Gießen

OEHM, U.; SCHLEY, P. (1992):

Kontrast- und Vitalfärbung von Bienenspermien.

Mitteilung für Bienenbesamung, 4: 6-11

PAGE, R. E.; LAIDLAW, H. H. (1882)

Closed population honeybee breeding. 1. Population genetics of sex determination.

Journal of Apicultural Research, 21: 30-37

PAGE, R. E.; LAIDLAW, H. H. (1882)

Closed population honeybee breeding. 2. Comparative methods of stock maintenance and selective breeding.

Journal of Apicultural Research, 21: 38-44

PAGE, R. E.; LAIDLAW, H. H. (1883)

Closed population honeybee breeding. 3. The distribution of sex alleles with gyne supersedure.

Journal of Apicultural Research, 22: 184-190

PAGE, R. E.; LAIDLAW, H. H. (1885)

Closed population honeybee breeding. The distribution of sex alleles with top crossing.

Journal of Apicultural Research, 24: 38-42

PEER, D. F. (1956):

Multiple mating of queen honey bees.

Journal of Economical Entomology, Vol. 49, 741-743

PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E. R. S. (2000):

Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains

Propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability.

Journal of Reproduction and Fertility, 118, 145-152

POOLE, H. K.; EDWARDS, J. F. (1971):

Effect of toxic and non-toxic sugars on motility of honey bee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa.

Experientia, 28: 235

POOLE, H. K.; TABER, III, S. (1969):

A method of in vitro storage of honey bee semen.

American Bee Journal, 109: 420-421

RIESENBECK, A.; VÖLGER, D.; HOFFMANN, B. (2001):

Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma.

Tierärztl. Praxis; 29 (K): 116-120

ROSSIGNOL, P. A.; ROYCE, L. A.; STRINGER, B. A. (1993):

Paarungsverhalten der Honigbiene (*Apis mellifera* L.) in einer Beobachtungskammer.

Bee Science, 2: 77-81

RUTTNER, F. (1954):

Mehrfache Begattung der Bienenkönigin.

Zool. Anz. 153: 99-105

RUTTNER, F. (1956):

Zur Frage der Spermaübertragung bei der Bienenkönigin.

Insectes Sociaux, 3: 351-359

RUTTNER, F.; WOYKE, J.; TRIASKO, V.; MACKENSEN, O.; DRESCHER, W. (1978):

The instrumental insemination of the queen honeybee.

Apimondia, Bukarest

SCHLEY, P. (1994):

Instrumentelle Besamung von Bienenköniginnen.

Kurzanleitung, Gießen

SCHLÜNS, H.; MORITZ, R.F.A.; KOENIGER, G. (2002):

Frequency distributions of patrilineages in the honeybee genus *apis* L..

Zoology 105, Supplement V (DZG 95.1)

TABER, S.; WENDEL, J. (1958):

Concerning the number of times the queen bees mate.

Journal of Economical Entomology, 51: 786-789

TIESLER, F.-K.; ENGLERT, E. (1989):

Aufzucht, Paarung und Verwertung von Königinnen.

Ehrenwirth Verlag, München

VERMA, L. R. (1973a):

Osmotic analysis of honeybee (*A. mellifera*) semen and haemolymph.

American Bee Journal, 113: 412

VERMA, L. R. (1973b):

An ionic basis for a possible mechanism of sperm survival in the spermatheca of the queen honey bee (*apis mellifera*).

Comp. Biochem. Physiol., 44: 1325-1331

VERMA, L. R. (1978):

Biology of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa

I. Effect of different diluents on motility and survival.

Apidologie, 9: 167-174

WATSON, P. F. (1976) in:

HOLT, W. V. (2000):

Basic aspects of frozen storage of semen.

Animal Reproduction Science 62: 3-22

WEILER, M. (2000):

Der Mensch und die Bienen.

Verlag lebendige Erde, Darmstadt

WILLIAMS, J. L.; HARBO, J. R. (1982):

Bioassay for diluents of honey bee semen.

Annals of the Entomological Society of America, 75: 457-459

WOYKE, J. (1962):

Natural and artificial insemination of honeybees.

Bee World, 43: 21-25

WOYKE, J. (1963):

Die Wirkung aufeinanderfolgender Drohnen auf die Besamung der Königin

XIX. Apimondia. Prag.

WOYKE, J. (1975):

Natural and instrumentally insemination of *Apis cerena indica* in India.

Journal of Apicultural Research, 14: 153-159

WOYKE, J. (1985):

Instrumental insemination of honey-bee queens in the development of beekeeping.

World Animal Review, 56: 40-44

WOYKE, J.; JASINSKI, Z. (1973):

Influence of external conditions on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated honeybee queens.

Journal of Apicultural Research, 12: 145-151

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
Cl; Cl ₂	Chlor
Eidotzus.	Eidotterzusatz
EinflFa.	Einflussfaktoren
gef.	gefasert
HDLGN	Hessisches Dienstleistungszentrum für Landwirtschaft, Gartenbau und Naturschutz
HOS	Hypoosmotischer Schwelltest
H ₂ O	Wasser
HSB	hinterer aufgerollter Schwanzbereich
i.	instrumentell
Interakt.	Interaktion der Einflussfaktoren
K ;K ⁺	Kalium (-Ionen)
Kap.	Kapitel
KBK	Kirchhainer Begattungs-Kästchen
Mg; Mg ²⁺	Magnesium (-Ionen)
Mio.	Millionen
MSB	mittlerer aufgerollter Schwanzbereich
n	Probenumfang
Na; Na ⁺	Natrium (-Ionen)
n.s.	nicht signifikant
ORW	Osmotischer Resistenzwert
p	Wahrscheinlichkeitskoeffizient

PBS	engl.: phosphate buffered saline = Puffersalze nach Dulbecco
pers.	persönlich
Phos., PP	Phosphat
Pkt.	Punkte
Pufferver.	Pufferverwendung
r	Korrelationskoeffizient
s.	siehe
S.	Seite
SF	Streufaktor
SD	engl.: Standard-Deviation = Standardabweichung
SpThekFüll	Spermathekaufüllung
Tris., TP	Tris-Puffer
Vergr.	Vergrößerung
VSB	hinterer aufgerollter Schwanzbereich
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
\bar{x}_g	geometrischer Mittelwert
z. B.	zum Beispiel



**Abb. 38: Mehrere
Drohnenträger**



**Abb. 39: Christine F.
bei Arbeiten am
Drohnenträger**

Die Abbildungen 38 und 39 veranschaulichen den Aufbau eines Drohnenträgers, in dem Drohnen bis zur Geschlechtsreife verbleiben (s. Kap.3.1.1). An sonnigen oder warmen Tagen drängen die älteren Drohnen nach oben. Dies wird genutzt, um die Drohnen zur Spermaentnahme durch ein Loch in der Abdeckung „abzusammeln“ .

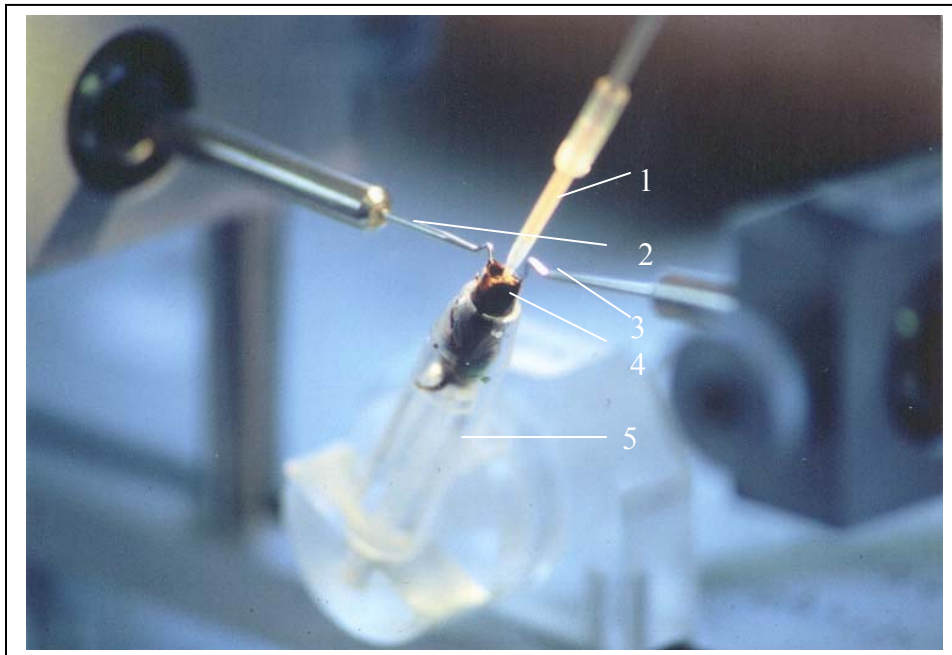


Abb. 40 : Instrumentelle Besamung einer Bienenkönigin

Legende zu Abb. 40: 1= Mikrokapillare mit Spermasäule
2= Ventralhäkchen zum Fixieren des letzten Ventralschuppensegments
3= Dorsalhäkchen mit feinem Loch zum Fixieren des Stachels
4= Aufgespannter Hinterleib der Königin
5= Königinnenhalter aus Plexiglas

Abbildung 40 zeigt, wie die Glaskapillare mit dem Sperma in die Geschlechtsöffnung der Königin eingeführt wird (s. Kap. 3.5).

Am Tag vor der instrumentellen Besamung werden die Königinnen zur ersten CO₂-Begasung in die Einhandkäfige verbracht. Nachdem sie aus der Narkose erwacht sind, werden diese Käfige verschlossen bis zum nächsten Tag in die angestammten KBK's gehängt (s. Kap. 3.4). Das feine Gitter erlaubt die Versorgung und Pflege der Königin durch die Arbeiterinnen. Nach der instrumentellen Besamung am nächsten Tag wird die Öffnung des Käfigs mit Futterteig verschlossen (s. Abb. 41).



Abb. 41: Königin im mit Futterteig verschlossenen Einhandkäfig

Sobald die Königin aus der Narkose erwacht ist, wird der Käfig wieder in das jeweilige KBK verbracht. Die Arbeiterinnen fressen nun ihre – ihnen fremd erscheinende - Königin frei. Es ist von Vorteil, sich das Volk erst wieder langsam an ihre Königin gewöhnen zu lassen, da so eventuell auftretenden Aggressionen gegen diese entgegen gewirkt werden kann.

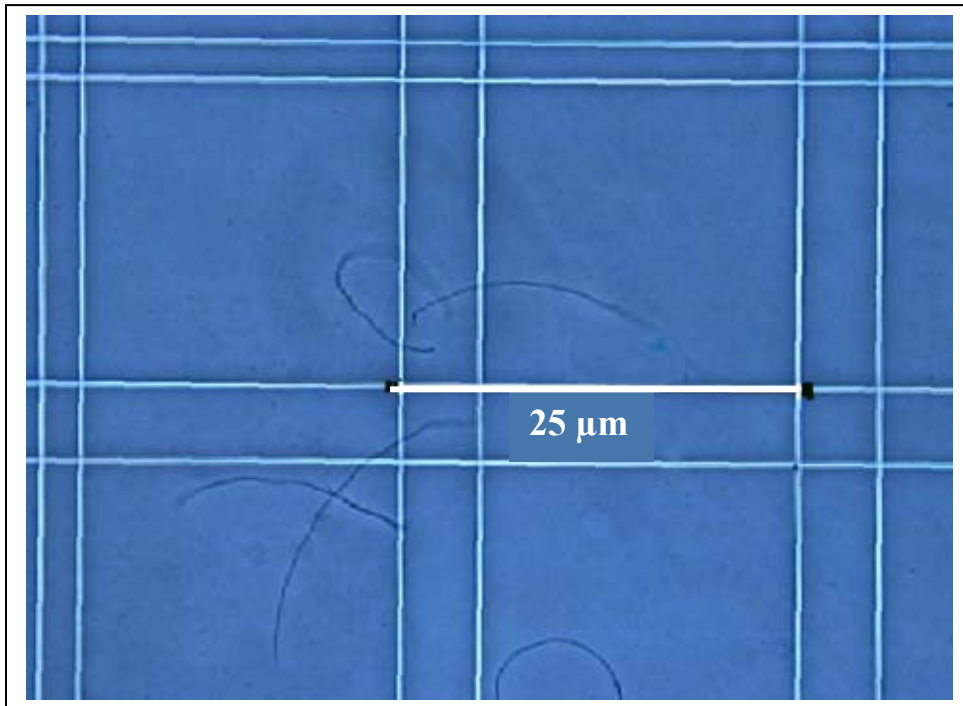


Abb. 42: Einige Spermien bei der Auszählung in der Bürker-Zählkammer

Um alle Spermien erfassen zu können, muss beim Auszählen ständig fokussiert werden. Um eine Anordnung der Spermien in einer Ebene zu erreichen, ist es hilfreich die Zählkammer mindestens 10 Minuten stehen zu lassen (s. Kap. 3.6.1).

Danksagung

Herzlichen Dank sage ich allen, die mich in so vielfältiger Weise unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Hoffmann für die stets geduldige und kompetente Hilfe bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Büchler danke ich herzlich für seine Beratung bei der Planung und der Betreuung der Versuche in Kirchhain, das Überlassen von Literatur und die Hilfe bei Computer-relevanten Problemen.

Herrn Professor Schley sei an dieser Stelle für das Stellen des Themas und die Hilfestellung bei der Materialsuche gedankt.

Auch Herrn Hubbe, Frau Leider und allen Mitarbeitern im HDLGN Kirchhain herzlichen Dank für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima.

Den Mitarbeitern der Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II, insbesondere Frau Dr. Riesenbeck und Frau Bach, als auch Frau Völger, danke ich für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und ihre liebevolle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Frau Dr. Königer aus dem Bieneninstitut in Oberursel danke ich für ihre Kooperation; ebenso vielen Ungenannten für die Zusendung von Literatur-Material ein herzliches Dankeschön!

Ganz herzlich danke ich Dr. Failing und Herrn Heiter stellvertretend für alle Mitarbeiter des Rechenzentrums der Justus-Liebig-Universität für die Berechnung der Ergebnisse und ihre Geduld beim Beantworten meiner vielen Fragen.

Auch sage ich Herrn Leuthner für die Erst-Korrektur dieser Arbeit vielen Dank!

Für die Korrektur der englischen Kommunikation danke ich Frau Bartel sehr.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Christina Weimer für ein offenes Ohr zur rechten Zeit und meinen Schwiegereltern für ihre allzeit gewährte Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Jens, der mir trotz mancher Belastung durch diese Arbeit seine Liebe und Zuneigung schenkte.